



Adriana Bastos Cruz
Licenciada em Bioquímica

**Radiomarcção de dendrímeros de poliureia e
síntese de sondas fluorescentes para teranóstica do
cancro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Jorge Dias Parola

Arguente: Doutor José António Pais Silva

Vogal: Douto Vasco Daniel Bigas Bonifácio



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2019

Adriana Bastos Cruz

Licenciada em Bioquímica

**Radiomarcção de dendrímeros de poliureia e síntese de sondas fluorescentes
para teranóstica do cancro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Doutor Vasco D.B. Bonifácio, IST-UL

Copyright © - Adriana Bastos Cruz, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

No dia em que escrevo para todos os corações que me ajudaram a chegar até aqui, é difícil esconder a emoção que o final desta etapa me oferece. Quando comecei a minha jornada académica este sonho ainda estava muito longe, tão longe que eu não lhe conseguia chegar. E hoje chegou. Terminar esta etapa não representa, para mim, apenas obter mais um grau académico. Representa o caminho que tive que percorrer. Todos os esforços e obstáculos que ultrapassei, porque sempre acreditei que é preciso sonhar e que, um dia eu chegaria a este sítio. Hoje, no dia em que esta viagem termina, finalmente percebo que, se estivermos rodeados das pessoas certas, chegamos a qualquer sítio do mundo.

Em primeiro lugar, preciso de agradecer a uma pessoa muito especial. A primeira pessoa da minha vida que me ajudou a lutar todos os dias pelos meus sonhos, que me apoiou e amou na mesma medida, ou sem medida nenhuma, a minha mãe. Agradeço-lhe, do fundo do meu coração, por todos os esforços que fez ao longo da sua vida, para que eu concretizasse os meus sonhos. Mas a minha mãe não é a única pessoa que desde cedo me amou, a minha irmã também o fez e, hoje, enche-se de orgulho pelo meu percurso, e não há nada mais bonito na vida, do que sermos amados por quem amamos. Agradeço também ao meu avô, pela sabedoria e paz que me dá sempre e por toda a esperança que depositou em mim.

Em segundo lugar, agradeço ao mentor deste projeto. Agradeço a uma pessoa muito importante durante o percurso dos últimos meses, o meu orientador, o Dr. Vasco Bonifácio. Agradeço-lhe não só o conhecimento e a paciência, como a amizade com que me brindou e brinda quem tem a sorte de trabalhar com ele. Agradeço também à Rita, a pessoa que só não tem o nome no papel, mas que, foi um grande suporte durante todo o meu trabalho. A Rita, que me ajudou todos os dias, que me tirou as dúvidas, que me ensinou, e que acima de tudo, foi uma grande amiga. Obrigado por tudo! Não posso, também, deixar de agradecer às meninas do gabinete 1.02., por todas as paródias, risadas e desabafos.

Agradeço também ao grupo de Ciências Radiofarmêuticas, do C²TN, por me terem aceito e recebido tão bem durante a última fase do meu trabalho experimental. Um especial agradecimento à Dra. Cristina Oliveira, à Dra. Célia Fernandes, à Dra. Paula Raposinho e ao Dr. António Rocha Paulo.

No entanto, ao longo do meu percurso, estive rodeada de pessoas que me acompanharam e viram crescer. Pessoas que me ajudaram a nunca desistir dos meus sonhos, os meus amigos. Agradeço à Catarina, a minha melhor amiga e irmã do coração. A ela que, melhor do que eu, soube sempre do que eu era capaz. Ela que sempre me incentivou a trabalhar cada vez melhor, a nunca deixar de ser eu. Nunca terei palavras suficientes para agradecer o amor

todo que me dá. Agradeço, também, à Mariana por todos estes anos de amizade e cumplicidade e por saber, melhor que eu, que sempre foi aqui que eu quis chegar. Obrigada! Não podia esquecer a Beatriz, uma grande e eterna companheira de vida, que me acompanha há anos suficientes para me esquecer quantos já passaram. Para ela, um obrigado por todos os momentos em que me deu força e sonhou para mim um futuro cheio de coisas boas!

Agradeço também aos amigos com quem me cruzei durante a minha licenciatura e que, ainda hoje, fazem parte da minha vida. A Beatriz, a Filipa, o Filipe, o Zé, o Frederico, o Bruno e a Joana. Agradeço-lhes por escreverem ao meu lado a história da nossa amizade, cheia de bons momentos. Agradeço, com especial emoção, ao Edgar, o meu eterno colega de laboratório, por todos os momentos em que solucionou os meus problemas e ouviu os meus desabafos. Agradeço-lhe por acreditar em mim nas alturas em que não era capaz. Obrigado! Agradeço também à Joana e à Andreia que, apesar de terem chegado tarde à minha vida, sinto-as como se estivessem desde de sempre ao meu lado. A elas, ao coração delas e à alma delas, um obrigado!

Em último lugar, e porque as palavras nunca chegarão para mostrar a minha profunda gratidão, agradeço ao Samuel. Ao Samuel amigo, namorado, companheiro. Agradeço ao Samuel que está todos os dias comigo e que me dá o amor todo do mundo. Agradeço ao Samuel por lutar comigo por um futuro mais risonho, por acreditar que a ciência tem um lugar especial no mundo. Para ti, um obrigado nunca será suficiente.

E, porque a memória atraiçoa todas as pessoas que escrevem com o coração, perdoem-me aqueles de quem me esqueci. No entanto, o meu coração nunca vos esquece.

«Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.»

Clarice Lispector

Resumo

O cancro do ovário é a doença mais letal do aparelho reprodutor feminino representando cerca de 4% das doenças malignas diagnosticadas na mulher. Em Portugal, em 2018, foram diagnosticados 574 novos casos e registadas 412 mortes.

No presente trabalho foram adotadas estratégias de reconhecimento molecular tendo como alvos o recetor do folato (FR- α) e proteínas de membrana, glicosiladas, usando dendrímeros de poliureia funcionalizados com ácido fólico (PURE-FA) e sondas fluorescentes com emissão no infravermelho próximo (esquaraínas), respetivamente.

Da síntese de esquaraínas, foi selecionada uma sonda bifuncionalizada com ácidos borónicos (SQ-BA), com uma cor azul e emissão a 724 nm. A radiomarcagem de SQ-BA com iodo-125 foi investigada usando vários métodos, tendo-se verificado que a radioiodação mediada por agentes oxidantes não é adequada, sendo o método mais promissor a radiomarcagem mediada por cobre.

O dendrímero de poliureia de quarta geração funcionalizado com ácido fólico foi radiomarcado com tecnécio-99m (^{99m}Tc -PURE_{G4}-FA) com elevado rendimento (90%) e sem recurso ao uso de ligandos. Nos ensaios preliminares de captação celular e internalização celular de ^{99m}Tc -PURE_{G4}-FA, usando uma linha celular de cancro do ovário (OVCAR8,) verificou-se uma baixa internalização (9.1%, 4 horas) relativamente ao controlo (^{99m}Tc -PURE_{G4}, 27.7%, 2 horas).

Palavras – chave: nanoteranóstica, reconhecimento molecular, cancro do ovário, dendrímeros de poliureia, esquaraínas, radiosótopos

Abstract

Ovarian cancer is the most lethal disease of the female reproductive tract, accounting for about 4% of all malignancies diagnosed in women. In Portugal, in 2018, 574 new cases were diagnosed, and 412 deaths were recorded.

In the present work, folic acid functionalized polyurea dendrimers (PURE-FA) and fluorescent probes with near infrared emission (squaraines) were synthesised, thus allowing a molecular recognition strategy to target the folate receptor (FR- α) and glycosylated membrane proteins, both highly expressed in ovarian cancer.

A bifunctional NIR squaraine dye having boronic acids units (SQ-BA), with emission at 724 nm, was selected for radiolabelling studies using iodide-125. Among the tested methods, it was found that oxidative radioiodination leads to a complex mixture, being the copper-mediated radiolabelling the most effective protocol.

A fourth-generation polyurea dendrimers surface functionalized with folic acid was radiolabeled with technetium-99m (^{99m}Tc -PURE_{G4}-FA) in high yield (90%) and without the use of scorpionate ligands. In preliminary uptake and cellular internalization assays using ^{99m}Tc -PURE_{G4}-FA and the OVCAR8 ovarian cancer cell line a low internalization (9.1%, 4 hours) was observed, in contrast with the control assay (^{99m}Tc -PURE_{G4}, 27.7%, 2 hours).

Keywords: nanotheranostics, molecular recognition, ovarian cancer, polyurea dendrimers, squaraines, radioisotopes

Índice

1. Introdução	1
1.1. Cancro do ovário	2
1.1.1. Incidência e fatores de risco	2
1.1.2. Classificação histológica	3
1.1.3. Diagnóstico e tratamento	4
1.2. O reconhecimento molecular como estratégia de diagnóstico	5
1.2.1. Importância do domínio glicosilado de proteínas membranares	5
1.2.2. Uso do folato no reconhecimento do recetor do ácido fólico – FR- α	10
1.3. Imagiologia molecular – O papel da medicina nuclear na teranóstica	13
1.3.1. Uso do iodo-125 em radioterapia	14
1.3.2. Uso do Tecnécio 99m em radioterapia	15
1.4. Objetivo do trabalho	16
2. Materiais e Métodos	17
2.1. Reagentes e Solventes	18
2.2. Equipamento	18
2.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)	18
2.2.2. Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC)	18
2.2.4. Gerador para eluição de [$^{99m}\text{TcO}_4$] $^-$	18
2.2.5. Câmara de ionização	19
2.3. Síntese de sondas fluorescentes	19
Preparação de esquaraínas do tipo A. Foram sintetizadas esquaraínas do tipo A recorrendo a uma metodologia reportada na literatura. [55]	19
Preparação de esquaraínas do tipo B. Foram sintetizadas esquaraínas do tipo B recorrendo a uma metodologia reportada na literatura.	19
2.4. Radioquímica	22
2.4.3. Radiomarcção de PURE _{G4} e PURE _{G4} -FA	24
2.4.4. Ensaio de internalização e captação celulares	25
3. Resultados e discussão	27
3.1. Síntese de esquaraínas	28

3.2. Marcações radioisotópicas.....	35
3.2.1. Marcação de SQ-BA com iodo-125	35
3.2.2. Marcação de PURE _{G4} -FA com tecnécio-99m.....	41
3.3. Estudos de captação e internalização celular	48
4. Conclusões e perspectivas futuras	51
5. Bibliografia	53
6. Anexos	59

Índice de figuras

Figura 1.1. Esquema geral do estadiamento do cancro do ovário. [12,13].....	4
Figura 1.2. Estrutura de monossacarídeos presentes na composição de glicoproteínas. Adaptado de [17].....	6
Figura 1.3. Estrutura química de esquaraínas do tipo A e do tipo B, simétricas (em cima) e assimétricas (em baixo).	9
Figura 1.4. Estrutura da primeira esquaraína desenhada para reconhecimento de monossacáridos.[29].....	9
Figura 1.5. Mecanismo de endocitose de um conjugado de ácido fólico, mediado pelo recetor FR. [34].....	11
Figura 1.6. Estrutura química dos dendrímeros de poliureia (PURE) e respetiva representação da sua estrutura, para as gerações 4, 5 e 6.	12
Figura 1.7. Estrutura do complexo organometálico de ^{99m}Tc tricarbonilo.....	15
Figura 3. 1. Espectro de RMN de ^1H da esquaraína SQ-BA em $\text{DMSO}-d_6$	34
Figura 3.2. Espectros de RMN de ^1H dos produtos de hidrólise dde SQ-BA em $\text{DMSO}-d_6$. (A) produto di-hidrolisado (B) produto mono-hidrolisado.....	35
Figura 3.3. Cromatograma de HPLC do 125-iodobenzeno, produto da radioiodação do ácido fenilborónico ($\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ 60:40, $t_r = 9.13$ min).....	36
Figura 3.4. Cromatograma de HPLC de SQ-BA ($\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ em gradiente 5-100%, seguido de CH_3CN em gradiente 100-5%, $t_r = 8.66$ min).....	37
Figura 3.5. Estrutura química dos agentes oxidantes testados nos métodos de radioiodação de SQ-BA.	38
Figura 3.6. Cronatogramas (UV) da radioiodação da SQ-BA: A) usando cloroamina-T, 30 min; B) usando cloroamina-T, 2 h; C) usando iodogénio, 5 min e D) usando iodogénio, 2 h.....	38
Figura 3.7. Cromatograma de HPLC Gama das espécies radioativas. Estão assinalados os picos correspondentes a ^{125}I -SQ-BA ($t_r = 14.91$ min) e ^{125}I -SQ ($t_r = 17.65$ min).....	41
Figura 3.8. Esquema representativo da possível coordenação de $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com os grupos terminais de PURE_{G4}	42
Figura 3.9. iTLC-SG das espécies $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (esquerda) e $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (direita), realizadas em metiletilcetona.	42
Figura 3.10. iTLC-SG do produto ^{99m}Tc - PURE_{G4} em 100% metiletilcetona.	43
Figura 3.11. Controlo da estabilidade de ^{99m}Tc - PURE_{G4} em PBS a 36°C , durante (A) 2 horas e (B) 24 horas usando iTLC-SG em metiletilcetona.....	44
Figura 3.12. iTLC-SG de ^{99m}Tc - PURE_{G4} -FA antes (esquerda) a após (direita) purificação (Amicon®3K, 12 000 rpm).....	45
Figura 3.13. Cromatogramas de HPLC para PURE_{G4} (em cima, $t_r = 15.48$ min) e para PURE_{G4} -FA (em baixo, $t_r = 14.33$ e 14.87 min).	46
Figura 3.14. Captação celular (esquerda) e internalização celular (direita) dos dendrímeros radiomarcados não purificados.	49

Figura 3.15. Captação celular (esquerda) e internalização celular (direita) para os dendrímeros radiomarcados purificados.	49
Figura 6.1. ^1H NMR em $\text{DMSO-}d_6$ do intermediário 3	60
Figura 6.2. ^1H NMR em $\text{DMSO-}d_6$ do intermediário SQ-IND (4).	60
Figura 6.3. ^1H RMN em MeOD do éster da indolenina (5).	61
Figura 6.4. Cromatograma (gama) da radioiodação da SQ-BA mediada por CAT – 2 horas de reação.	61

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Ácido bórico e derivados.....	7
Tabela 1.2. Isótopos radioativos de iodo usados em aplicações médicas.[47]	14
Tabela 3.1. Síntese de esquaraínas do tipo A.	28
Tabela 3.2. Tempos de retenção dos derivados oxidados de SQ-BA e dos produtos radioativos correspondentes.....	40
Tabela 3.3. Tempos de retenção das espécies precursoras usadas na radiomarcção e dendrímeros radiomarcados.	46
Tabela 3.4. Resumo dos tempos de retenção dos produtos ^{99m}Tc -PURE _{G4} e ^{99m}Tc -PURE _{G4} -FA, antes e depois da purificação.....	47
Tabela 3.5. Valores de coeficiente de partição (LogP) para os radioligandos em estudo.....	48

Lista de Abreviaturas

BSA	Albumina do soro bovino
CA125	Antigénio Cancerígeno 125
CAT	Cloroamina-T
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EOC	Cancro Epitelial do Ovário
ESI-MS	Espectrometria de Massa de Ionização por Electrospray
FBS	Soro fetal bovino
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FR-α	Isoforma α do Recetor de Ácido Fólico
HE4	Proteína Epididimal Humana
iTLC-SG	Cromatografia Instantânea de Camada Fina com fibra de vidro impregnada com Sílica Gel
MRI	Ressonância Magnética de Imagem
NIR	Região Próxima do Infravermelho
PAMAM	Dendrímero de poliaminoamida
PBS	Solução tampão fosfato
PET	Tomografia de Emissão de Positrão
PURE	Dendrímeros de Poliureia
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa
SPECT	Tomografia Computorizada de Emissão de Fotão Único
TC	Tomografia Computorizada

1. Introdução

1.1. Cancro do ovário

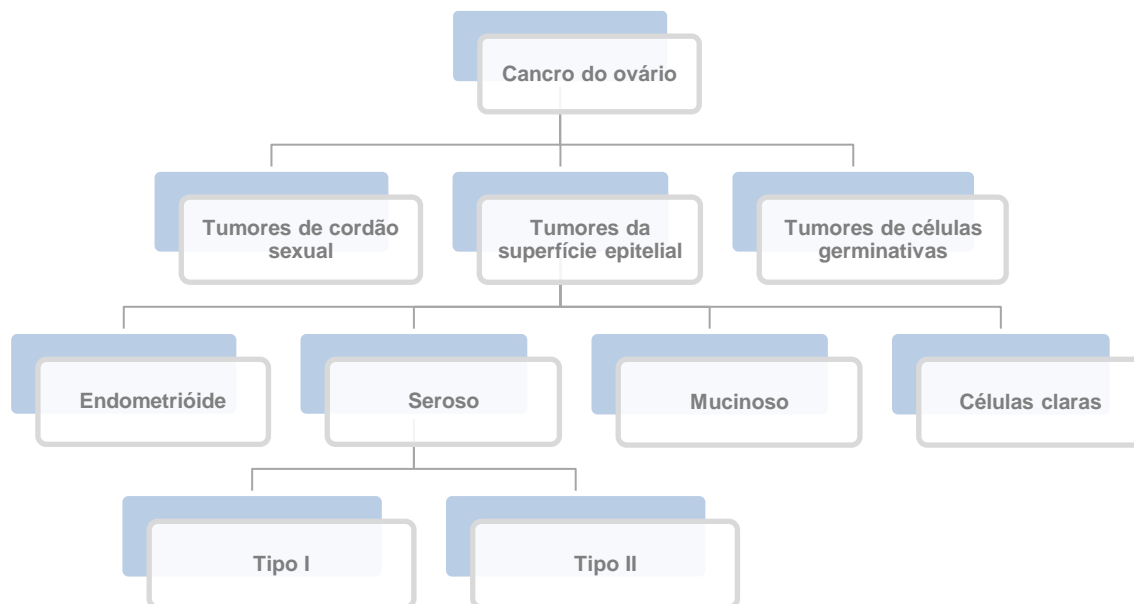
1.1.1. Incidência e fatores de risco

O cancro do ovário é a doença mais letal do aparelho reprodutor feminino representando cerca de 4% das doenças malignas diagnosticadas na mulher.[1] Em 2012, foram registados 238.700 novos casos em todo o mundo, dos quais resultaram 151.900 mortes. [2] Nas últimas estatísticas, disponibilizadas em 2018, observou-se um aumento do número de casos diagnosticados (295.414) assim como do número associado de mortes (184.799).[3] Apesar de terem sido diagnosticados mais casos, não se observa uma redução do número de mortes, o que é um indicador da urgência em resolver este problema. No continente americano, nomeadamente nos Estados Unidos, o cancro do ovário foi considerado a quinta maior causa de morte em mulheres, tendo sido estimados 107.470 novos casos em 2017. [4,5] Na Ásia, apesar de a taxa de incidência ser menor, estimaram-se 52.100 novos casos no ano de 2015. [2] No entanto, é na Europa que se regista uma maior incidência de carcinoma do ovário. Países como o Reino Unido, Irlanda, Dinamarca e países de leste são os que apresentam uma taxa mais elevada de novos casos. [6] Em Portugal, em 2018, foram diagnosticados 574 novos casos e registadas 412 mortes, números que seguem a linha de tendência observada a nível global. [7]

Existem alguns fatores de risco associados à elevada incidência deste carcinoma, estando maioritariamente associados a desequilíbrios/patologias do aparelho reprodutor feminino como endometrioses, doenças pélvicas inflamatórias e menstruações anormais. [2] A nuliparidade (ausência de gravidez), que pode ou não advir da infertilidade feminina, e um número elevado de ciclos ovulatórios estão também associados a um maior risco de cancro do ovário. Um processo de ovulação muito intenso em algumas mulheres, também classificado como ovulação ininterrupta, resulta num ciclo de dano/reparação na superfície epitelial do ovário, que pode ou não promover mutações. Estas, podem evoluir para patologias malignas, podendo ainda contribuir para a formação de quistos de inclusão na superfície do ovário, que criam um microambiente ideal para o desenvolvimento tumoral. [8] A administração de hormonas no período da menopausa e a idade tardia em que esta ocorre na mulher também compreendem este grupo. [7,8] A obesidade e o tabagismo (no caso do carcinoma do tipo mucinoso) têm sido associados ao surgimento de cancro do ovário. A predisposição genética e o histórico familiar representam também uma percentagem significativa no número de casos. [9] Por outro lado, tem-se verificado que uma gravidez em idade avançada e a toma da pílula oral contraceptiva podem contribuir para uma diminuição do risco de cancro do ovário epitelial até 30%. [10]

1.1.2. Classificação histológica

Classificar o cancro do ovário e a sua origem histológica é complexo, uma vez que o ovário é composto por diferentes tipos de células. De acordo com a proposta classificativa da Organização Mundial de Saúde, é possível separar os tumores ováricos primários em carcinomas epiteliais, carcinomas do estroma e carcinoma de células germinativas (Esquema 1.1). [1] Dentro deste grupo, o cancro do ovário epitelial (EOC) é o mais comum, representando 58% dos casos. A família dos tumores epiteliais primários pode ainda ser dividida em: seroso (50-60% dos casos), mucinoso e endometrióide. Os tumores de Brenner, de células claras e o seromucinoso representam outros três tipos de tumores epiteliais, no entanto, observados em menor percentagem. De acordo com a sua morfologia ainda é possível dividir cada tipo em benigno, com baixo potencial maligno ou *boderline* e maligno. [9,10]



Esquema 1.1. Classificação histológica do cancro do ovário de acordo com a Organização Mundial de Saúde. [1]

O estadiamento do cancro do ovário é feito de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), podendo esta neoplasia apresentar quatro estadios, I-IV, sendo que os primeiros três ainda se subdividem. [12] Na Figura 1.1 encontra-se uma descrição geral dos quatros estadios do carcinoma do ovário.

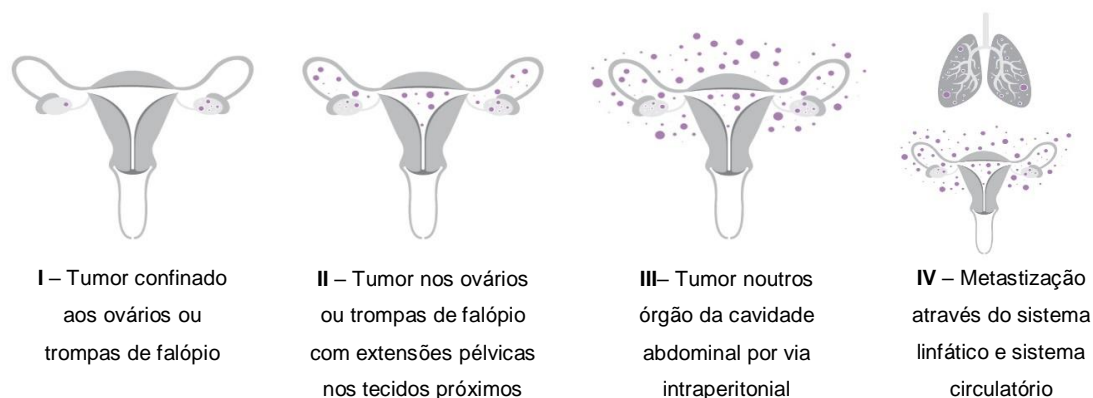


Figura 1.1. Esquema geral do estadiamento do cancro do ovário. [12,13]

1.1.3. Diagnóstico e tratamento

«Enquanto a mortalidade por cancro do ovário se mantiver elevada, a deteção precoce do cancro em estadios iniciais constitui um enorme desafio. Porém, os testes atualmente disponíveis carecem de sensibilidade e especificidade adequadas, ou seja, não existe um método de rastreio eficaz.» Fernando Mota em Compêndio de Ginecologia Oncológica, 2012.

O cancro do ovário caracteriza-se por ser uma doença assintomática, uma vez que, numa fase primária os sintomas são muito inespecíficos. Sintomas como dor pélvica, fadiga ou falta de ar podem ser indicativos de um carcinoma em estadio inicial. Por este motivo, a maioria dos casos são diagnosticados apenas nos estadios III e IV, onde os sintomas são mais severos. Em pacientes que apresentam sintomas indicativos de uma neoplasia maligna é iniciado o diagnóstico de confirmação.[6] Numa primeira fase, é efetuado um exame pélvico e retovaginal, aos quais se seguem exames complementares como a ultrassonografia abdominal e transvaginal, quantificação de biomarcadores, PET (Tomografia Emissão de Positrão) e TC (Tomografia Computorizada). Numa última fase é feito o estadiamento e o diagnóstico final recorrendo a cirurgia. [4]

Neste cenário, com base nesta metodologia de diagnóstico, é de referir que apenas 15-20% dos casos são diagnosticados em estadios iniciais. No entanto, está comprovado clinicamente que a deteção precoce aumenta a taxa de sobrevivência a 5 anos em cerca de 90%, sendo, portanto, urgente o desenvolvimento de novos métodos de detecção.

Após a confirmação do diagnóstico, é iniciado o tratamento, que numa primeira fase assenta numa cirurgia citoredutora, tendo como principal objetivo a remoção da massa tumoral. Em estadios avançados não é possível a realização desta cirurgia, iniciando-se o tratamento com uma quimioterapia neoadjuvante ou de primeira linha. [14]

1.1.3.1. Diagnóstico usando biomarcadores

Um dos biomarcadores largamente usado em diagnóstico do cancro do ovário é o antígeno cancerígeno 125 (CA125). Este marcador tumoral, também conhecido por MUC16, foi descoberto por Bast e seus colaboradores em 1981 e, desde então, representa uma ferramenta crucial para diagnóstico e tratamento do cancro do ovário. [15] O CA125 é expresso como uma proteína transmembranar nas células do epitélio Mülleriano ou numa forma solúvel em fluídos corporais, que no seu domínio extracelular apresenta uma intensa glicosilação. [1,7]

Em estadios iniciais da doença, os seus valores não são significativos, sendo que apenas em 50% dos casos diagnosticados nesta fase, é visível um aumento da concentração deste biomarcador. Nos estadios III e IV cerca de 80% das pacientes apresentam valores de CA125 muito elevados. No entanto, quantificar apenas os níveis deste marcador não é suficiente, uma vez que esses valores podem estar associados a outras patologias como endometrioses ou doença inflamatória pélvica e doenças malignas como o cancro da mama. Desta forma, é usada a combinação do CA125 com outros biomarcadores como a proteína epididimal humana 4 (HE4). [4,11]

1.2. O reconhecimento molecular como estratégia de diagnóstico

O reconhecimento molecular é um processo vital em sistemas biológicos. Atualmente, muitas estratégias de diagnóstico são baseadas neste processo, e consistem na produção de materiais funcionalizados (nanopartículas, sondas fluorescentes, complexos supramoleculares) para reconhecer um alvo específico. A estratégia adotada neste trabalho, explorou o reconhecimento molecular de dois alvos, as glicoproteínas de membrana e o seu domínio glicosilado, e o recetor FR- α para o ácido fólico, amplamente expressos em células do cancro do ovário.

1.2.1. Importância do domínio glicosilado de proteínas membranares

No presente trabalho, um dos alvos celulares são as glicoproteínas membranares, através do seu domínio glicosilado. A escolha deste alvo é relevante uma vez que estes domínios, estando presentes na superfície membranar, permitem um reconhecimento mais eficaz das células alvo. As glicoproteínas são proteínas que contêm oligossacarídeos ligados covalentemente ao seu domínio peptídico. Por apresentarem funções complexas, aparecem como enzimas, hormonas, constituintes do grupo sanguíneo e ainda como componentes da

membrana celular. A sua composição orgânica passa por proteínas e monossacarídeos. A Figura 1.2, mostra alguns monossacarídeos que podem estar presentes nos resíduos do domínio glicosilado das glicoproteínas, sendo um dos mais comum o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), um derivado do ácido siálico. [16]

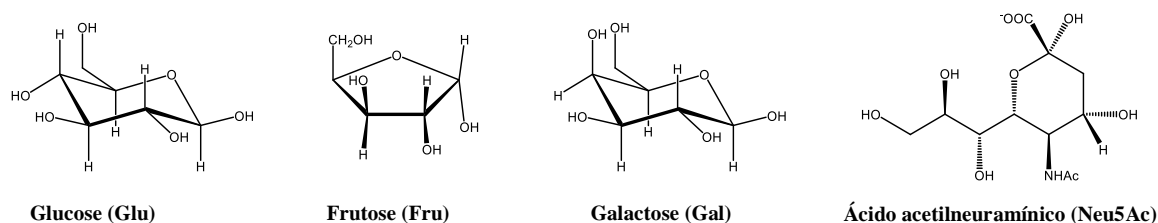


Figura 1.2. Estrutura de monossacarídeos presentes na composição de glicoproteínas. Adaptado de [17].

É sabido que nas células cancerígenas ocorrem alterações na glicosilação de proteínas e, consequentemente, maior expressão do domínio glicosilado. Este processo é promovido pela alteração da expressão da glicosiltransferase, enzima responsável pela reação de glicosilação. Uma expressão desregulada desta enzima promove modificações na estrutura principal dos domínios *N*-glicosilado e *O*-glicosilado, assim como no aumento da ramificação destes domínios, que conduz a um maior número de resíduos terminais de monossacarídeos. Em muitos casos, estas mudanças estão associadas ao diagnóstico de tumores em estado avançado e também à sua evolução e metastização. [18] Um dos principais indicadores desta desregulação é a alteração dos níveis da enzima sialiltransferase no complexo de Golgi de células tumorais e, consequentemente, a alteração da expressão do ácido siálico, tornando este monossacárido num possível biomarcador tumoral.[17,18]

No cancro do ovário estas alterações também se verificam, podendo relacionar-se com a evolução do tumor. Neste caso, as glicoproteínas séricas representam um papel crucial como biomarcadores, pois os seus níveis alteram-se na presença de algumas patologias como doenças autoimunes, doenças cardiovasculares ou carcinomas. Os níveis destas proteínas pode ser um indicador da eficácia do tratamento, uma vez que, estão diretamente relacionadas com a resposta à quimioterapia. [16]

Para que se torne possível quantificar e detetar a presença destas glicoproteínas é necessário desenvolver sensores capazes de reconhecer os resíduos terminais do seu domínio glicosilado, como o ácido siálico. Lorand e Edwards, em 1959, quantificaram pela primeira vez a afinidade dos ácidos bórico e fenilborónico para dióis simples, normalmente presentes em sacáridos. [21] Os resíduos que integram o domínio glicosídico de glicoproteínas, como a glucose, frutose ou galactose, ácido siálico, entre outros, apresentam na sua estrutura 1,2- e 1,3-dióis e podem ocorrer sob a forma de furanose ou piranose. [17]

Aliando a estrutura química dos resíduos presentes em glicoproteínas e as propriedades de reconhecimento dos ácidos borônicos é possível desenhar e construir novos sensores para uso no diagnóstico do cancro.

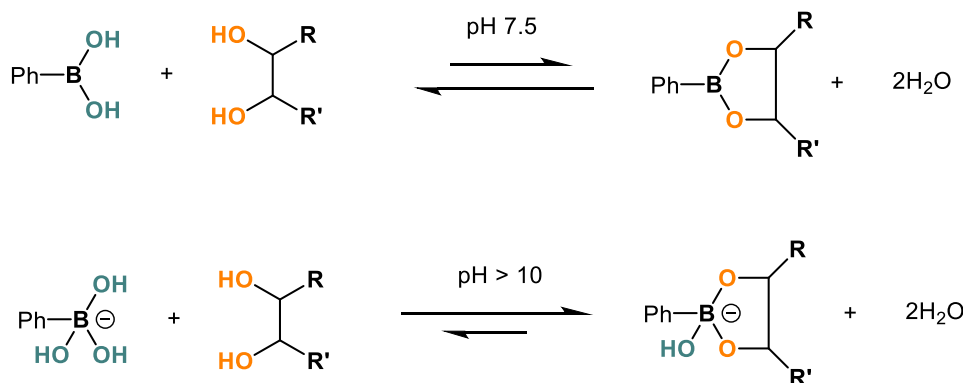
1.2.1.1. O ácido borónico no reconhecimento de mono e polissacarídeos

Os ácidos borônicos podem ser classificados, de acordo com o grau de substituição do átomo de boro, em ácido bórico, ácido borónico e ácido borínico (tabela 1.1). [22]

Tabela 1.1. Ácido bórico e derivados.

Ácido bórico	Ácido borónico	Ácido borínico
$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{B}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{B}-\text{OH} \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{B}-\text{OH} \\ \\ \text{R} \end{array}$

A interação destes compostos com dióis, em especial os vicinais (hidroxilos substituídos nas posições 1,2), dá-se covalentemente, formando um produto designado por éster boronato, que pode ser neutro ou aniónico dependendo do pH do meio reacional. No Esquema 1.2, estão representados os produtos resultantes da reação entre o ácido fenilborónico e um diól vicinal. Dependendo da natureza do grupo borónico, o produto resultante da ligação aos grupos dióis, pode variar.



Esquema 1.2. Esquema geral dos complexos resultantes da reação do ácido fenilborónico com um 1,2-diol. [23,24]

A interação de ácidos borónicos com 1,2- e 1,3-dióis é suficientemente forte para permitir a ligação a sacáridos numa escala de concentração sub-mM. A afinidade de ligação depende da orientação assim como da posição relativa dos grupos hidroxilo sendo que *cis*-1,2-

diol > 1,3-diol >> *trans*-1,2-diol. Relativamente aos diferentes monossacarídeos, a afinidade também pode variar: frutose > galactose > manose > glucose. [22,25]

Por este motivo, têm vindo a ser desenvolvidos sensores de sacáridos baseados em ácidos borónicos tendo em vista várias aplicações biológicas, tais como a monitorização de glucose no sangue ou a identificação de sacáridos presentes em membranas celulares. [20] Estes ligandos podem agrupar-se em quatro categorias: anticorpos, lectinas, aptâmeros baseados em ácidos nucleicos e pequenas moléculas que mimetizam as lectinas. Das várias hipóteses, as lectinas apresentam-se como uma ferramenta muito útil e versátil no reconhecimento de sacáridos. [24]

A reação entre dióis e derivados do ácido bórico é uma reação de condensação facilmente reversível em meio aquoso. Esta reversibilidade permite uma monitorização sensível através de uma diminuição da fluorescência ou através do aumento do sinal de fluorescência pela eliminação de mecanismos de extinção. [20] No entanto, o design de borolectinas fluorescentes, como sensores de sacáridos em meio biológico, compreende algumas características fundamentais: biocompatibilidade, elevada solubilidade em água, baixa toxicidade e comprimentos de onda de absorção/emissão na zona do infravermelho próximo (NIR). [26]

1.2.1.2. Uso de esquaraínas no reconhecimento de sacáridos

No design de sensores de sacáridos é necessário ter em consideração determinadas propriedades óticas. Um requisito crucial é a emissão na região NIR (650-900nm). A tecnologia de imagem explorando esta região tem-se revelado importante no diagnóstico precoce do cancro. Uma das principais vantagens do uso de composto com emissão na NIR é a ausência de autofluorescência dos tecidos biológicos nesta região, permitindo assim que sondas baseadas em esquaraínas, ftalocianinas e derivados de porfirina tenham sido já exploradas com sucesso. [27]

As esquaraínas destacam-se neste grupo de sondas por apresentarem uma elevada emissão na região do infravermelho próximo e terem também elevados coeficientes de absortividade molar e rendimentos quânticos de fluorescência. As esquaraínas resultam normalmente da reação de condensação entre uma molécula de ácido esquárico e duas moléculas aromáticas.[28] Dependendo da unidade aromática usada na reação de condensação, podemos ter dois tipos: as esquaraínas do tipo A, em que a unidade aromática é um derivado do benzeno (areno), e as esquaraínas do tipo B, em que unidade aromática é um derivado da indolenina (arilideno) (Figura 1.3).

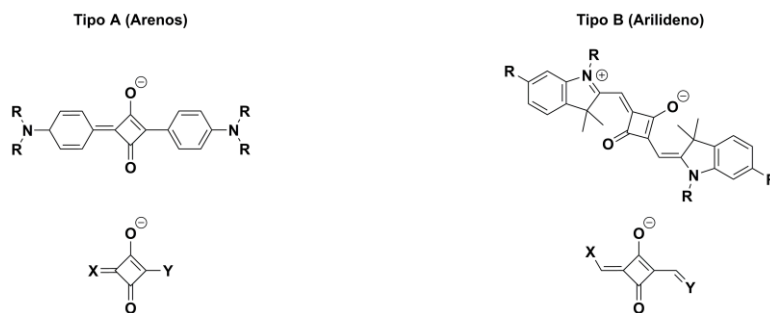


Figura 1.3. Estrutura química de esquaraínas do tipo A e do tipo B, simétricas (em cima) e assimétricas (em baixo).

Pelas suas excelentes propriedades, as esquaraínas têm sido usadas em estudos *in vivo*, nomeadamente usando grupos borônicos para o reconhecimento de sacáridos. A primeira referência a esta estratégia foi reportada em 1999, por Kukrer e Akkaya, num estudo onde foi usada uma esquaraína simétrica para o reconhecimento de sacáridos (Figura 1.4). [29] No entanto, a maior parte de sondas fluorescentes contendo ácido borônicos na sua estrutura, na generalidade, conduz à extinção da fluorescência, promovida pela formação de agregados, o que não é vantajoso em aplicações *in vivo*. [28,29]

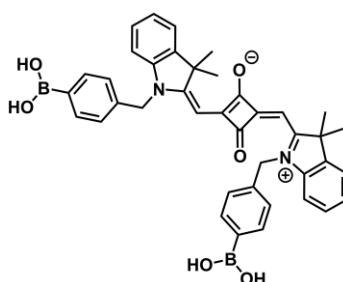


Figura 1.4. Estrutura da primeira esquaraína desenhada para reconhecimento de monossacáridos.[29]

Mais recentemente, em 2014, usando esta estratégia, Ouchi e colaboradores, desenvolveram um conjunto de esquaraínas assimétricas com um grupo de ácido borónico para fazer o reconhecimento do ácido siálico. Neste trabalho verificou-se que nas sondas sintetizadas ocorre um aumento de intensidade de fluorescência, associada à formação do boronato cíclico resultante da reação com grupo *cis*-diol do ácido siálico. Este aumento da fluorescência foi explicado por uma dissociação dos agregados π - π característicos nesta classe de compostos [28,29]. Este trabalho veio também mostrar ser possível o reconhecimento do ácido siálico (resíduo predominante nos terminais glicosídicos de proteínas membranares), usando este tipo de esquaraínas.

1.2.2. Uso do folato no reconhecimento do recetor do ácido fólico – FR- α

1.2.2.1. Importância do FR- α no cancro do ovário

Em contexto biológico os recetores são proteínas, de estrutura complexa, que apresentam afinidade com ligandos específicos através de um processo de reconhecimento molecular. [17] O recetor do folato (FR) é uma proteína *N*-glicosilada que apresenta uma grande afinidade para o ácido fólico e pode expressar-se em quatro isoformas: α , β , γ/γ' e δ . A expressão deste recetor em tecidos normais é limitada, com exceção da isoforma α que é expressa em alguns tecidos na superfície apical do epitélio. O recetor FR- α é amplamente expresso em alguns cancros, como o do ovário, pulmão e da mama, sendo que essa elevada expressão é ainda mais evidente quando a origem é epitelial. [32]

No cancro do ovário, 80% dos carcinomas epiteliais apresentam uma elevada concentração deste recetor, que se pode correlacionar com o grau histológico da doença. [33,34] Sabe-se também que, a expressão elevada de FR- α contribui para o desenvolvimento tumoral na medida em que este recetor está envolvido na regulação do crescimento e sinalização celular. A captação celular do ácido fólico pode promover a translocação do FR- α para o núcleo e a ação deste como fator de transcrição, intervindo assim no metabolismo tumoral. Para além desta influência, a captação deste ligando também contribui para a proliferação celular de células cancerígenas, a migração e a diminuição de adesão, aumentando assim a motilidade celular e a formação de metástases. [35] O bloqueio destes recetores com conjugados de ácido fólico inibe a captação do ligando natural, diminuindo os danos celulares. As propriedades biológicas associadas a FR- α fazem deste recetor um alvo para o reconhecimento molecular através de duas estratégias principais: formação de conjugados com anticorpos anti-FR ou a formação de conjugados com a molécula de folato. [36] Várias estratégias de reconhecimento molecular do FR- α têm sido aplicadas na clínica. Neste grupo incluem-se os derivados do ácido fólico, conjugados fármaco-folato, terapias com células T e anticorpos monoclonais. [37]

A vasta gama de moléculas com as quais é possível conjugar o ácido fólico, torna esta estratégia promissora para o uso do recetor FR- α como alvo. Na Figura 1.5 está representado o mecanismo geral de endocitose de um conjugado de ácido fólico, mediado pelo recetor FR- α . [34]

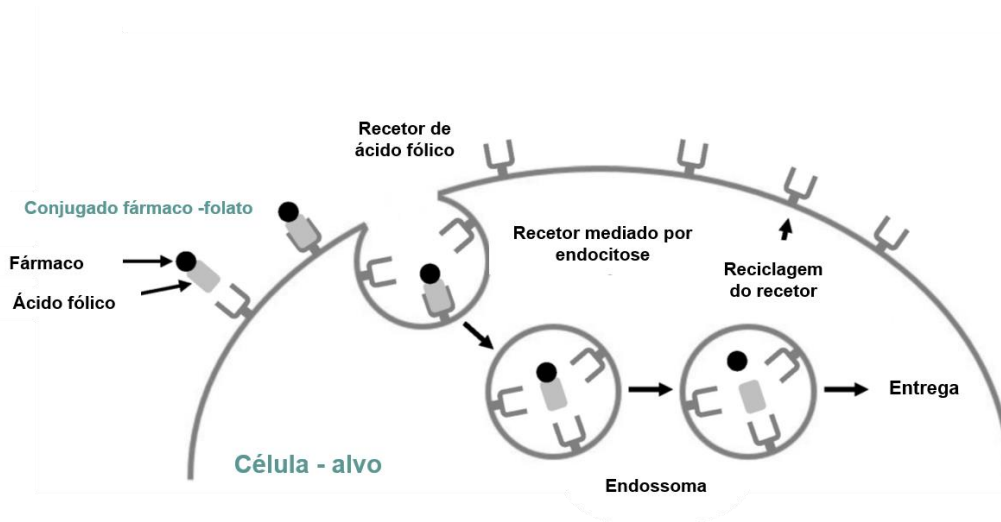


Figura 1.5. Mecanismo de endocitose de um conjugado de ácido fólico, mediado pelo recetor FR.
[34]

1.2.2.2. Uso de dendrímeros como agentes de teranóstica

A conjugação com o ácido fólico pode efetuar-se não só com pequenas moléculas, mas também com nanopartículas poliméricas, funcionando estas como nanoveículos. Esta estratégia tem ainda a vantagem de permitir a conjugação de várias moléculas de folato numa só partícula, promovendo interações multivalentes e aumentando a afinidade com o recetor. [36] O recurso a nanopartículas poliméricas com estrutura tridimensional, tem despertado o interesse da comunidade médica, justificada pela aplicação destes nanomateriais na libertação controlada de fármacos e na permeabilização de membranas biológicas. [38]

Os dendrímeros são polímeros com uma estrutura dendrítica (híper ramificada) muito versátil, onde poderão ser variadas quer as unidades de repetição (núcleo e cadeias) quer a funcionalização nos grupos terminais (superfície). [38] A palavra dendrímero tem origem na palavra grega *dendron* que significa árvore ou ramos. A sua síntese pode ser convergente ou divergente. Normalmente é usada uma síntese do tipo divergente, onde o crescimento do polímero é feito a partir de uma molécula central (núcleo). O crescimento é feito por etapas (camadas) e pode ser comparada ao crescimento de uma cebola. Essas camadas designam-se por gerações (G_n), onde n é o número da geração ou camada, e o seu número pode influenciar as propriedades do dendrímero. Cada dendrímero apresenta um tamanho e peso molecular definidos, assim como um determinado grupo funcional terminal. [39] Para aplicações em nanomedicina, os dendrímeros são geralmente modificados na sua superfície, fazendo reagir os grupos terminais (*e.g.* aminas primárias) com moléculas de interesse. Para alvos moleculares, os grupos periféricos dos dendrímeros permitem uma conjugação covalente com ligandos

específicos para um dado reconhecimento, como acontece com as células cancerígenas. [39] A interação entre o ligando, ligado ao dendrímero, e as células tumorais, conduz à captação celular por endocitose mediada por recetor. [40] A funcionalização de dendrímeros com ligando de ácido fólico é um exemplo de aplicação, dado que a expressão do seu recetor (FR- α) é mais elevada em células tumorais. [32]

Os dendrímeros podem também ser aplicados em terapia direcionada, tirando partido da sua capacidade de carga (por encapsulamento), atuando como nanoveículos. Nesta perspetiva, estas macromoléculas têm a capacidade não só de aumentar a estabilidade dos fármacos encapsulados, mas também de fazer a sua entrega ao nível celular. [38] Por estarem disponíveis comercialmente, os dendrímeros de poliaminoamida (PAMAM) e poli(propilenoimina) (PPI), têm sido os mais amplamente usados. Apesar de comerciais, os PAMAM apresentam uma citotoxicidade significativa para gerações mais elevadas, o que representa uma desvantagem. No sentido de combater este problema, foram feitos já alguns esforços para obter dendrímeros biodegradáveis, nomeadamente possuindo ligações éster nas suas cadeias. [41]

Seguindo esta estratégia, foi recentemente sintetizada uma nova classe de dendrímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Os dendrímeros de poliureia (PURE) são constituídos por unidades de ureia provenientes da incorporação de dióxido de carbono na estrutura do polímero durante o processo de síntese (Figura 1.6).

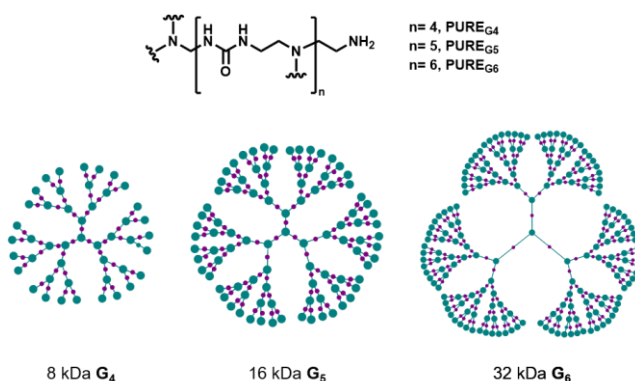


Figura 1.6. Estrutura química dos dendrímeros de poliureia (PURE) e respetiva representação da sua estrutura, para as gerações 4, 5 e 6.

Estes dendrímeros não são citotóxicos, e apresentam uma fluorescência azul intrínseca, sensível ao pH, verificando-se um aumento de intensidade de fluorescência proporcional à diminuição de pH. A sensibilidade ao pH permite o uso dos PURE em situações que o pH seja baixo, tal como em tecidos tumorais, devido a uma maior produção de ácido láctico. Das seis gerações destes dendrímeros, é visível um aumento mais acentuado nos PURE_{G4}. Para além da sensibilidade ao ambiente, os PURE têm a capacidade de penetrar a

membrana celular e o invólucro nuclear, podendo ser aplicados em nanomedicina como nanoveículos para agentes terapêuticos. [41]

1.3. Imagiologia molecular – O papel da medicina nuclear na teranóstica

A imagiologia molecular permite uma caracterização não invasiva de processos celulares. Atualmente, várias técnicas abrangem esta estratégia: imagem ótica, ressonância magnética de imagem (MRI), tomografia computadorizada (TC), tomografia de emissão de positrão (PET) e tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT). Na ausência de uma técnica que combine as características ideais para imagiologia (elevada sensibilidade, especificidade e resolução espacial e temporal), estas técnicas são combinadas numa abordagem multimodal. [42]

Por apresentarem a capacidade de detetar alterações moleculares e celulares na doença, o SPECT e o PET são duas técnicas de diagnóstico amplamente usadas. Estão incluídas na área da imagiologia molecular nuclear e os produtos radioativos administrados são classificados como radiofármacos. O PET apresenta maior sensibilidade relativamente ao SPECT, apesar da última permitir trabalhar num espectro de energias maior. Esta abordagem é útil não só para o diagnóstico clínico, como também na avaliação de uma terapia ou tratamento e evolução da doença, contribuindo para uma medicina mais personalizada. [42]

Os radiofármacos incluem um radionuclídeo na sua constituição e diferem dos fármacos comuns por não promoverem uma resposta farmacológica devido às baixas concentrações em que são administrados, normalmente nanomolares. De um modo geral, um radiofármaco é direcionado para um grupo de células ou tecidos usando alvos moleculares. [43]

O uso de radioisótopos em diagnóstico médico surgiu na década de 1940, e tem vindo a apresentar relevância quer no diagnóstico quer na terapia de várias doenças. A maioria dos radionuclídeos usados em diagnóstico são emissores gama (γ) contudo, para efeitos terapêuticos, são usados os emissores de partículas beta (β) uma vez que promovem uma lesão celular mais eficaz. No entanto, o interesse pelo potencial terapêutico de emissores de partículas alfa (α) e de eletrões Auger tem vindo a aumentar. [38] Desta forma, é possível tirar partido das propriedades de emissão de radioisótopos, combinando o diagnóstico e a terapia - teranóstica. Em medicina nuclear, este termo foi introduzido por volta dos anos 80, quando isótopos de índio foram usados para diagnóstico e terapia de doenças da tiroide. Esta abordagem permite uma seleção prévia dos pacientes mais aptos para o tratamento e o seu impacto no organismo, através de estudos de biodistribuição. Estas vantagens conduzem a uma terapia personalizada, sendo possível adequar a dose/tempo de tratamento a cada paciente. [44]

1.3.1. Uso do iodo-125 em radioterapia

A descoberta do potencial terapêutico dos isótopos de iodo no tratamento de disfunções da tireoide tornou-os radiofármacos de elevada importância em medicina nuclear. Na Tabela 1.2, encontram-se listados os radioisótopos de iodo mais comuns e as suas propriedades. O iodo-131 é o único isótopo radioativo que durante o seu tempo de vida emite radiação gama e beta e que por esse facto, pode ser aplicado em diagnóstico e terapia de várias doenças. O iodo-125 é um emissor gama e, portanto, é usado maioritariamente em diagnóstico. No entanto, este isótopo também apresenta propriedades para aplicação em braquiterapia e radioterapia direcionada. [43,45,46]

Tabela 1.2. Isótopos radioativos de iodo usados em aplicações médicas. [47]

Isótopo	Tempo de semi-vida ($t_{1/2}$)	Emissão	Aplicação
^{123}I	13 horas	γ	SPECT
^{124}I	4.18 dias	β	PET
^{125}I	59 dias	γ	Radioterapia SPECT
^{131}I	8.1 dias	γ, β	Radioterapia PET e SPECT

Os radiofármacos contendo isótopos radioativos de iodo têm desempenhado um papel importante na medicina nuclear e na imagiologia molecular, quer pelas suas propriedades químicas que pela sua disponibilidade. Assim, a marcação de pequenas moléculas, péptidos, proteínas e anticorpos com radioisótopos de iodo tem um grande impacto no desenvolvimento de novas terapêuticas. [48]

Os métodos sintéticos de radioiodação recorrem geralmente a agentes oxidantes que, por gerarem espécies eletrofílicas de iodo conduzem uma reação de substituição eletrofílica. Estas espécies reagem depois com um grupo aromático ativado. [48] Apesar de serem comuns, os métodos de radioiodação mediados por agentes oxidantes mostram algumas limitações. A cloroamina-T (CAT), um dos agentes oxidantes usados neste tipo de reações, promove a formação de subprodutos uma vez que o precursor não iodado é exposto a condições de oxidação muito agressivas. O baixo rendimento radioquímico associado a este agente oxidante é também um fator limitante deste método. [47] No entanto, a iodação pode ocorrer por outra via, nomeadamente através de uma substituição nucleofílica, como a introdução do isótopo de iodo

num anel aromático. Este método também apresenta algumas desvantagens, tais como temperaturas elevadas e baixa atividade específica, resultante da dificuldade em separar o produto radioiodado do seu precursor. Com o objetivo de otimizar as condições reacionais, em 2016, Zhang e colaboradores, estudaram as melhores condições de radiomarcagem de compostos aromáticos, usando precursores contendo um ácido borônico e um reagente de cobre como mediador. [48]

A radiohalogenação recorrendo a derivados de boro pode ser aplicada em medicina nuclear e em biologia, por apresentar baixa toxicidade, por esta razão a investigação nesta área tem vindo crescer nos últimos anos. [45,47]

1.3.2. Uso do Tecnécio 99m em diagnóstico

O radioisótopo tecnécio 99m (^{99m}Tc), é um emissor gama (140 keV) que apresenta um tempo de meia-vida de seis horas ($t_{1/2} = 6 \text{ h}$), sendo por esta razão o radioisótopo mais usado em SPECT para diagnóstico clínico. O ^{99m}Tc é um radioisótopo de baixo custo, obtido por um gerador de molibdénio $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. O radioisótopo ^{99m}Tc é eluído na coluna na forma de pertecnetato, $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$, com uma solução salina de NaCl. O tecnécio 99m pode apresentar diferentes estados de oxidação e, por consequência, várias geometrias de coordenação. Para ensaios de radiomarcagem é usado um radioisótopo com um estado de oxidação +1, na forma do complexo $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (Figura 1.7). O processo de marcação radioisotópica ocorre através da substituição das três moléculas de água pelo agente quelante ou do ligando a marcar. [52,53]

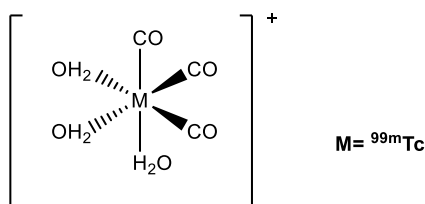


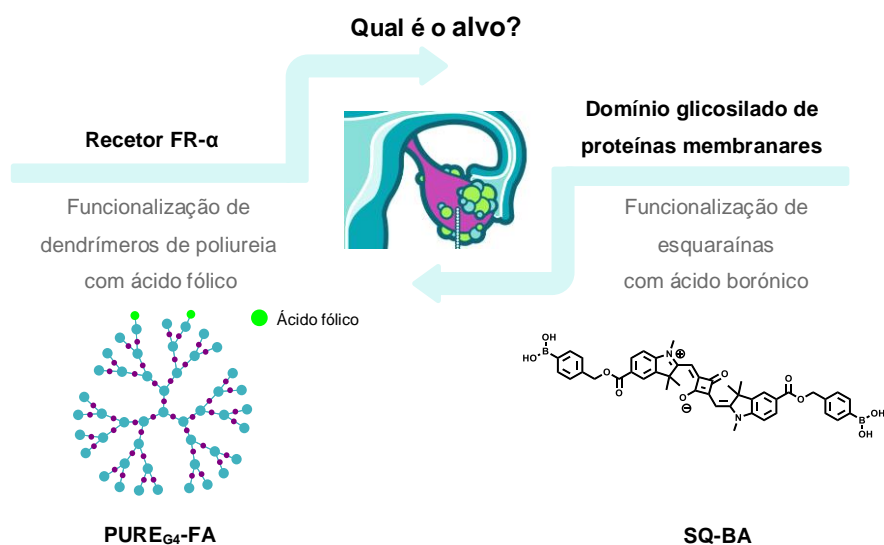
Figura 1.7. Estrutura do complexo organometálico de ^{99m}Tc tricarbonilo.

Existem já alguns exemplos de radiomarcagem de nanopartículas poliméricas. A introdução do radioisótopo é efetuada após funcionalização da superfícies dos polímeros com ligantes específicos. Estas metodologias implicam a síntese do ligando, normalmente usando vários passos de síntese, com isolamento de intermediários e um passo final em que ocorre a conjugação do ligando à superfície do polímero. Um exemplo desta estratégia é a radiomarcagem de dendrímeros PAMAM com ^{99m}Tc . Em 2016, Song e colaboradores, funcionalizaram PAMAM_{G3} com ácido fólico, para reconhecimento do recetor FR- α , e com um ligando para a

radiomarcção com o isótopo ^{99m}Tc . [54] Usando esta estratégia as técnicas PET e SPECT mostram-se sensíveis para o reconhecimento deste recetor. Este trabalho veio mostrar o potencial dos dendrímeros quer como nanoveículos de agentes terapêuticos, quer como agentes de diagnóstico para medicina nuclear.

1.4. Objetivo do trabalho

O principal objetivo deste trabalho passa pelo desenvolvimento de novas sondas fluorescentes e radiomarcção de dendrímeros de poliureia para radioteranóstica do cancro do ovário. Nesse sentido, foi desenhada uma estratégia de reconhecimento molecular tendo como base, alvos celulares que apresentam uma taxa de expressão elevada em células do carcinoma do ovário: o recetor membranar do ácido fólico (FR- α) e o domínio glicosilado de proteínas membranares. Para que o mecanismo de reconhecimento molecular seja eficaz, é necessário a preparação de materiais adequados para tal. Neste trabalho, a funcionalização de dendrímeros de poliureia com ácido fólico, ligando natural do recetor em estudo, permite a captação celular destas nanopartículas que também podem funcionar como nanoveículos, carregando um fármaco. Numa outra estratégia, para o reconhecimento dos resíduos mais expressos nos domínios glicosilados das proteínas membranares, proceder-se-á à síntese de esquaraínas com emissão no infravermelho próximo que, através da introdução de grupos borónicos na sua estrutura, irão permitir o reconhecimento desses resíduos, através da interação com os seus grupos dióis. Numa última fase do trabalho, a marcação radioisotópica destes materiais será a ligação para a possível aplicação destes materiais em diagnóstico e terapia do cancro do ovário.



Esquema 1.3. Representação do objetivo do trabalho a desenvolver.

2. | Materiais e Métodos

2.1. Reagentes e Solventes

Todos os reagentes e solventes foram fornecidos pela Sigma-Aldrich e utilizados sem qualquer purificação adicional. Os dendrímeros de poliureia (PURE) foram sintetizados de acordo com um protocolo descrito, de polimerização por supercríticos. [41]

2.2. Equipamento

2.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de próton (^1H) e carbono (^{13}C) foram traçados num espectrómetro Bruker Avance II 400 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha) usando frequências de 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C).

2.2.2. Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC)

A análise dos produtos radioativos e seus precursores foi feita recorrendo a cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC) usando um sistema da Perkin-Elmer equipado com uma coluna C18 de fase reversa, uma bomba quaternária biocompatível (series 200), um detetor UV-Vis (LC290 Perkin-Elmer; detecção UV a 280 nm) e um detetor γ (LB 509, Berthold). Para os dois radioisótopos em estudo, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{125}I , foram usados dois sistemas de HPLC diferentes, onde se variou o radioisótopo para o qual o detetor γ foi calibrado. O sistema de solventes assim como o gradiente usado foram otimizados para os diferentes analitos.

2.2.3. Espectrómetro de massa (ESI-MS)

A análise por espectrometria de massa de ionização electrospray (ESI-MS) foi obtida usando um espectrómetro de massa com ionização por electro-vaporização/captura de iões por quadrupolos (ESI/QIT) da Bruker HCT, Bruker, Billerica, MA, USA.

2.2.4. Gerador para eluição de $[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$

A eluição da espécie $[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ foi feita a partir de um gerador de $^{99\text{M}}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ da Drytec®, GE Healthcare.

2.2.5. Câmara de ionização

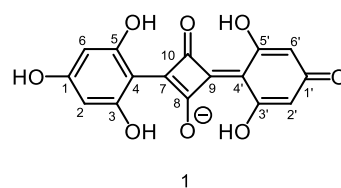
A radioatividade das soluções de ^{99m}Tc e ^{125}I foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curiemeter IGC-3).

2.3. Síntese de sondas fluorescentes

Preparação de esquaraínas do tipo A. Foram sintetizadas esquaraínas do tipo A recorrendo a uma metodologia reportada na literatura. [55]

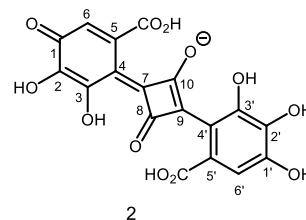
SQ-1 (1)

Num balão de fundo redondo de 50 mL colocaram-se 100 mg de floroglucinol (2 equiv., 0.79 mmol), 45.22 mg de ácido esquárico (1 equiv., 0.40 mmol) e 5 mL de ácido acético. A mistura reacional foi deixada sob agitação em refluxo durante a noite. Em seguida, evaporou-se a mistura reacional à secura, obtendo-se um sólido de cor de rosa com um rendimento quantitativo. ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 6.13 (s, 1H, H-6'), 6.02 (s, 1H, H-2'), 5.86 (s, 2H, H-2, H-6).



SQ-2 (2)

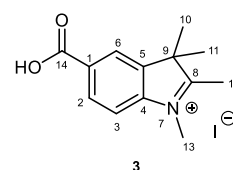
Seguindo o protocolo descrito para a síntese de **1**, 100 mg de ácido gálico (2 equiv., 0.53 mmol) e 30.31 mg de ácido esquárico (1 equiv., 0.27 mmol) foram colocadas sob agitação em refluxo com 5 mL de ácido acético durante a noite. Evaporou-se a mistura reacional à secura e filtrou-se com Et_2O . A fase orgânica foi lavada com MeOH, tendo obtido um sólido de cor escura. Por RMN verificou-se ser uma mistura de **2** e material de partida.



Preparação de esquaraínas do tipo B. Foram sintetizadas esquaraínas do tipo B recorrendo a uma metodologia reportada na literatura.

Sal de iodo do ácido *N*-metil-2,3,3-trimetil-3H-indole-5-carboxílico (3) [56]

Num balão de 50 mL, 45.6 μL de iodometano (1equiv., 0.75 mmol) foram adicionados a 150 mg ácido 2,3,3-trimetil-3H-indole-5-carboxílico (1 equiv., 0.74 mmol) previamente dissolvidos em 10 mL de CH_3CN . Esta solução foi deixada sob agitação em refluxo durante a noite.

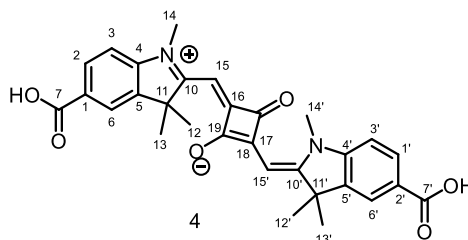


Seguidamente, o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com CH_3CN , obtendo-se um

sólido rosa claro com $\eta = 82\%$. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 8.38 (s, 1 H, H-6), 8.19 (d, $J=8$ Hz, 1H, H-2), 8.01 (d, $J= 8\text{Hz}$, 1H, H-3), 3.98 (s, 3H, H-13), 2.80 (s, 3H, H-12), 1.56 (s, 6H, H-10, H-11).

SQ-IND (4) [57]

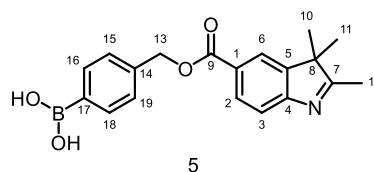
A um balão de 50 mL adicionaram-se 121.05 mg de **3** (2 equiv., 0.35 mmol) e 20 mg de ácido esquárico (1 equiv., 0.17 mmol). Depois de solubilizados em 30 mL de uma mistura tolueno/isopropanol (1:4), adicionaram-se 41 μL de quinolina (2 equiv., 0.35



mmol) à mistura reacional. Conectou-se um condensador de Dean-Stark ao balão e deixou-se a reagir sob agitação em refluxo durante dois dias. O precipitado formado no balão foi filtrado e lavado com Et_2O , obtendo-se um sólido verde com $\eta = 5\%$. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 8.02 (s, 2 H, H-6), 7.98–7.95 (dd, $J= 4$ Hz, 4Hz, 2H, H-2), 7.43 (d, $J= 8$ Hz, 2H, H-3), 5.86 (s, 2H, H-15), 3.61 (s, 3H, H-14), 1.71 (s, 12H, H-12, H-13).

Éster da indolenina (5) [58]

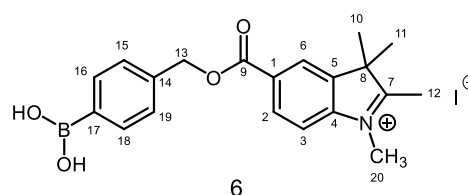
A um balão de 50 mL adicionaram-se 300 mg de ácido 4-hidroximetilfenil borónico (1 equiv., 1.47 mmol), 246.73 mg de ácido 2,3,3-trimetil-3H-indole-5- carboxílico (1 equiv., 1.62 mmol) e 28.73 mg de DMAP (0.16 equiv., 0.24 mmol)



que foram solubilizadas em 10 mL de CH_2Cl_2 . A esta mistura, adicionaram-se 288.13 mg de DCC (0.95 equiv., 1.39 mmol). Deixou-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Seguidamente, a mistura reacional foi filtrada e lavada com 20 mL de AcOEt . O filtrado foi recolhido e evaporado à secua obtendo-se um sólido laranja cristalino com $\eta = 91\%$. ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 8.05–7.96 (m, 4 H, H-15, H-16, H-18, H-19), 7.60 (bs, 2H, H-6), 7.49 (d, $J=8$ Hz, 2H, H-2), 7.42 (t, 2H, H-3), 5.34 (s, 2H, H-13), 2.30 (d, $J=8$ Hz, 6H, H-12), 1.32 (s, 12 H, H-10, H-11). O produto continha uma pequena contaminação com indolenina e foi usado no passo seguinte sem purificação.

Éster da indolenina *N*-metilada (6) [59]

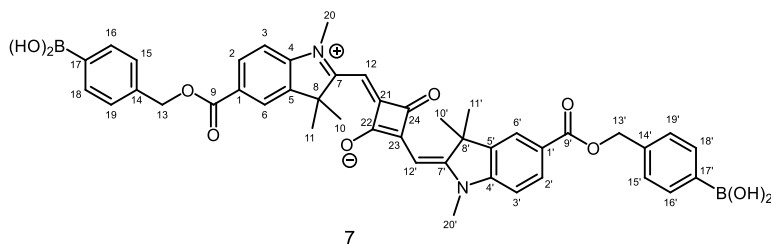
Num balão de fundo redondo colocou-se a agitar 780.08 mg (1 equiv., 2.31 mmol) do composto **5**, dissolvido em 10 mL de CH_3CN e ao qual se adicionaram 150 μL de CH_3I (1 equiv., 2.31 mmol). A



mistura reacional foi colocada sob agitação em refluxo durante a noite. Seguidamente, adicionou-se Et₂O à mistura reacional, formando-se um precipitado, que foi posteriormente filtrado e lavado novamente com Et₂O, obtendo-se um sólido cor de rosa escuro que foi seco sob vácuo (η = 68%). ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 8.34 – 8.25 (m, 3 H, H-2, H-3, H-6), 7.62 (d, J = 8 Hz, 2 H, H-16, H-18), 7.44 (d, J = 8, 2H, H-15, H-19), 5.39 (s, 2H, H-13), 4.05 (s, 3H, H-20), 1.61 (s, 6H, H-10), 1.60 (s, 6 H, H-11). O produto apresenta uma pequena contaminação com indolenina de partida, confirmada por RMN através dos sinais a 7.93–7.89 ppm e a 4.06 ppm.

Síntese de SQ-BA (7) [60]

Para um balão de 50 mL pesaram-se 88.96 mg de ácido esquárico (0.5 equiv., 0.78 mmol) e 750.4 mg de **6** (1equiv., 1.56 mmol) que



foram solubilizados em 30 mL de tolueno/isopropanol (4:1)¹. Seguidamente 184 μ L de quinolina (1 eq., 1.56 mmol) foram adicionados à mistura reacional. Conectou-se o condensador de Dean-Stark ao balão e a mistura reacional foi colocada sob agitação a 110 °C durante 2 dias. Não tendo sido possível a purificação do produto por precipitação da mistura reacional, foram feitas várias filtrações usando uma pequena coluna de sílica (AcOEt/MeOH 8:2). Desta filtração obteve-se o produto desejado e também os produto hidrolisados correspondentes. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.07 (s, 4H, H-2, H-6), 7.82 (d, J = 8Hz, 2 H, H-3), 7.49 – 7.40 (m, 8H, H-15, H-16, H-18, H-19), 5.87 (s, 2H, H-12), 5.37 (s, 4H, H-13), 3.61 (s, 6H, H-20), 1.71 (s, 12H, H-10, H-11). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 194.39, 167.51, 142.32, 134.95, 131.35, 130.10, 124.61, 122.14, 115.42, 65.70, 59.20, 57.27, 55.44, 51.08, 46.93, 42.79, 40.73, 38.55, 34.87, 32.34. ESI-MS (m/z): 779.2 [M-1]⁺, 674.4, 586.5 [C₃₆H₂₉N₂O₆]²⁺, 352.3, 218.2 [C₁₃H₁₄NO₂]²⁺. UV-Vis: $\lambda_{\text{máx}}$: 658 nm. Fluorescência: λ_{em} : 724 nm.

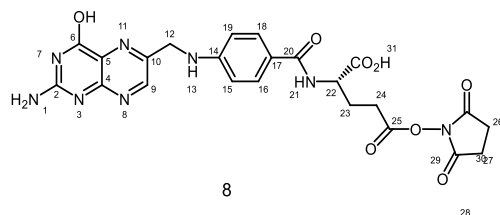
SQ-BA di-hidrolisada (DMSO-*d*₆) δ = 8.06–7.96 (m, 4 H), 7.43 (br, 3H) 5.86 (s, 2H), 3.61 (s, 6H), 1.71 (s, 12H) ppm.

SQ-BA mono-hidrolisada (DMSO-*d*₆) δ = 8.07-8.01 (m, 4 H), 7.50–7.40 (m, 6H) 5.86 (d, J = 8 Hz, 2 H), 5.39 (s, 2H), 3.61 (s, 3H), 1.61 (s, 6H), 1.60 (s, 6 H) ppm.

¹ Segundo o protocolo descrito em [58] a proporção de tolueno/isopropanol deveria ter sido 1:4. Contudo devido a um erro experimental, a proporção utilizada foi de 4:1.

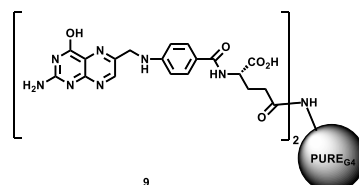
Síntese de FA-NHS (8)

A um balão de 50 mL adicionaram-se 250 mg de ácido fólico (1 equiv., 0.57 mmol) e 3 mL de DMSO. Depois de solubilizado, adicionaram-se 15 μ L de TEA (0.3 equiv., 0.18 mmol), 128.5 mg de DCC (1.09 equiv., 0.62 mmol) e 130.8 mg de NHS (2.36 equiv., 1.34 mmol) à mistura reacional, a qual foi colocada sob agitação, durante a noite à temperatura ambiente. Seguidamente, a TEA foi removida sob vácuo e o precipitado formado foi filtrado e lavado com Et₂O, tendo-se recolhido um sólido amarelo com η = 92%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.64 (s, 1H, H-9), 7.63 (d, *J*=4 Hz, 2H, H-16, H-18), 6.64 (d, *J*= 8Hz, 2H, H-19, H-15), 4.47 (d, *J*= 4Hz, 2H, H-12), 4.31 (bs, 1H, H-22), 2.54 (s, 4H, H-26, H-27), 2.31 – 2.28 (t, 2H, H-24), 1.98 (bs, 2H, H-23)



Síntese de PURE_{G4}-FA (9)

A um balão de 25 mL adicionaram-se 266 mg de PURE_{G4} (1 equiv., 0.032 mmol) e 36.20 mg de FA-NHS (2 equiv., 0.067 mmol), os quais foram solubilizados em 4 mL de DMSO. A esta solução foram adicionados 18 μ L de TEA (4 eq., 0.13 mmol) e a mistura reacional foi colocada em agitação à temperatura ambiente durante a noite. A TEA foi removida sob vácuo e o precipitado formado foi filtrado e lavado com Et₂O, obtendo-se um sólido com η = 73 %. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.63 (s, 1 H), 7.70-7.66(m, 4H), 6.84 (br, 4H), 4.61 (s, 2H), 3.34-3.08 (m, 180H), 2.77-2.60 (m, 462H)



2.4. Radioquímica

Todos os compostos radioativos foram manipulados de acordo com as regras de proteção e segurança radiológica, na presença de aparelhos de deteção de radiação, em laboratórios com sistemas de ventilação adequada e com pressão negativa relativamente ao exterior. Foram utilizados contentores de chumbo com a espessura apropriada, para a manipulação dos frascos contendo soluções radioativas de ^{99m}Tc, com o objetivo de proteger os operadores da radioatividade emitida. Todas as manipulações foram efetuadas com luvas de proteção, recorrendo a uma parede de chumbo com vidro, impregnado de sais de chumbo. Durante a fase experimental deste trabalho, recorreu-se ainda a detetores de radiação individuais, de peito e extremidades, para a rastreabilidade da dose de radiação absorvida, a qual foi obtida pela leitura periódica dos detetores. O radioisótopo iodo-125 foi devidamente manipulado numa caixa de luvas, a fim de evitar a sua inalação

2.4.1. Radioiodação do ácido fenil borónico [48]

A um frasco de vidro foram adicionados 50 μL de uma solução de Cu_2O (0.4 μmol) /1,10-Fenantrolina (0.8 μmol) e 150 μL de uma solução de PBA (6 μmol). Na caixa de luvas, foram adicionados 5 μL da mistura Na^{125}I (10.01 MBq). A mistura foi deixada durante 2 horas a 80 °C. O controlo do produto radioativo fez-se através de HPLC, usando um método isocrático, com uma fase móvel CH_3CN :0.1% TFA (60:40) e seguindo a absorção a 280 nm.

2.4.2. Radioiodação do SQ-BA

A sonda em estudo e os produtos de radiomarcção foram controlados por RP-HPLC, sem qualquer processo de purificação. Para este controlo usou-se um gradiente de 5–100% de CH_3CN em água (0.1% TFA) durante 20 min, permanecendo deste modo durante 5 minutos, voltando a uma composição de 5% de CH_3CN durante 12 min.

2.4.2.1. Radioiodação mediada por Cu(I)

A um vial de vidro foram adicionados 50 μL de uma solução de Cu_2O (0.4 μmol) /1,10-fenantrolina (0.8 μmol), 150 μL de uma solução de SQ-BA (1.15 μmol) e por último, 5 μL da mistura Na^{125}I (37.45 MBq). Deixou-se a mistura reagir durante 2 horas a 80 °C. O controlo do produto radioativo fez-se através de HPLC.

2.4.2.2. Radioiodação mediada por Cloroamina-T

Num vial de vidro colocaram-se 150 μL de uma solução de SQ-BA (1.15 μmol), 20 μL de CAT (0.759 μmol) e por último, 5 μL de Na^{125}I (13.50 MBq) em água. Ao fim de 10 min, a temperatura ambiente, adicionou-se 20 μL de tiosulfato de sódio (8 μmol), interrompendo a reação. O controlo do produto radioativo fez-se através de HPLC.

2.4.2.3. Radiodação mediada por Iodogénio

Para um tubo previamente revestido com 100 μg de iodogénio, em banho de gelo, mediram-se 50 μL de SQ-BA (0.38 mmol) e 50 μL da solução de tampão fosfato. A esta mistura foram adicionados 5 μL de Na^{125}I (3.36 MBq) em água, deixando-se nestas condições durante 5 minutos. A reação foi interrompida transferindo a mistura para um vial e fez-se o controlo do produto radioativo usando HPLC.

2.4.3. Radiomarcção de PURE_{G4} e PURE_{G4}-FA

2.4.3.1. Controle por HPLC

Foi possível estudar o perfil de PURE_{G4} e PURE_{G4}-FA, bem como fazer o controle dos produtos radioativos, usando HPLC. Para isso, usou-se um gradiente de 0-80% de CH₃CN (0.1% TFA) em água (0.1% TFA) em 10 min, permanecendo nesta percentagem durante 2 min e subindo para 100% durante 10 min.

2.4.3.2. Preparação do precursor *fac*-[^{99m}Tc (H₂O)₃(CO)₃]⁺

Eluiu-se a espécie pertecnetato [^{99m}TcO₄]⁻, a partir de um gerador de ⁹⁹M/^{99m}Tc, com 6 mL de uma solução de 0.9% (p/v) de NaCl. Seguidamente, adicionaram-se 3 mL da espécie eluída, a um kit constituído por boranocarbonato de sódio (4.0 mg), tartarato de sódio trihidratado (7.56 mg), tetraborato de sódio decahidratado (2.53 mg) e carbonato de sódio (7.56 mg), previamente colocado sob atmosfera de N₂ e encapsulado. Submeteu-se a mistura a 100 °C durante 30 min, tendo-se neutralizado a pH 7 com uma solução de 0.1 M HCl. Transferiu-se cerca de 1.5 mL da solução neutralizada e acertou-se o pH de acordo com o protocolo a usar.

A formação do precursor [^{99m}Tc (H₂O)₃(CO)₃]⁺, foi controlada por iTLC-SG usando como fase móvel uma solução de metiletilcetona, onde se observou a espécie marcada com um fator de retenção (R_f) entre 0.9 e 1.0.

2.4.3.3. Preparação de ^{99m}Tc-PURE_{G4} e ^{99m}Tc-PURE_{G4}-FA

A um vial de vidro adicionou-se cerca de 50 µL 10⁻³M de PURE_{G4}, colocando sob atmosfera inerte posteriormente. A esta solução adicionou-se também um determinado volume (950 ou 450 µL) de [^{99m}Tc (H₂O)₃(CO)₃]⁺ preparada no passo anterior, dependendo do protocolo. A mistura ficou a 100 °C durante 30 min. O controle fez-se por iTLC-SG, em metiletilcetona. Purificou-se o produto reacional por filtração, usando filtros Amicon de 3K, durante 7 min a 12 000 rpm. O produto purificado foi controlado pelo mesmo sistema de cromatografia.

O mesmo procedimento foi adaptado para a preparação de ^{99m}Tc-PURE_{G4}-FA, partindo inicialmente também de uma solução de 10⁻³M deste ligando. No entanto as condições de purificação foram 10 min, 14 000 rpm.

2.4.3.4. Estudo de estabilidade de $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$

Para avaliar a estabilidade de $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ a 37 °C mediram-se 100 µL da solução de $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e 200 µL de PBS (pH 7.4), para um eppendorf. A estabilidade foi controlada por iTLC-SG após duas e 24 horas. No caso do radioligando $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$ avaliou-se a estabilidade em meios de cultura dos ensaios de captação celular, a 37 °C. Dessa forma, colocaram-se 20 µL do radioligando em quatro eppendorfs diferentes. A dois adicionaram-se 20 µL de meio RPMI e DMEM e aos restantes, 40 µL de RPMI com 0.2% BSA e DMEM com 0.2% BSA. Todas as amostras ficaram a 16 horas a 37 °C e a estabilidade das mesmas foi controlada por iTLC-SG com metiletilcetona.

2.4.3.5. Determinação do coeficiente de partição

A lipofília de $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ foi avaliada através da determinação do coeficiente de partição num sistema bifásico de octanol/0.1M PBS pH 7.4. Num eppendorf foram colocados 400 µL de octanol e 400 µL da solução de 0.1 M de PBS pH 7.4, e levou-se a mistura ao vórtex. Foram adicionados 10 µL de $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e os eppendorfs foram novamente colocados no vórtex durante alguns minutos. As fases foram separadas, tendo sido, cada uma, distribuída por um total de quatro frascos, cada um com 100 µL. Essas alíquotas foram quantificadas, num contador γ (Berthold-LB 2111, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Baden-Württemberg, Alemanha). Através da atividade medida em cada fase, foi determinado o valor do coeficiente de partição que se apresenta em Log (Po/w). Este procedimento foi repetido para $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$.

2.4.4. Ensaios de internalização e captação celulares

Nestes ensaios utilizou-se a linha celular OVCAR8 do carcinoma do ovário, cedida pela Unidade de Investigação em Patobiologia Molecular (UIPM) do Instituto Português de Oncologia (Prof. Jacinta Serpa). Todos os meios de cultura e suplementos usados foram fornecidos por Gibco, Invitrogen, Reino Unido. O estudo de internalização e captação celular foi feito para os radioligandos $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$, antes e após a purificação.

2.4.4.1. Cultura e manutenção das linhas celulares

A linha celular OVCAR8 foi mantida em meio de cultura DMEM com Glutamax suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram incubadas em atmosfera húmida com 95% de ar e 5 % de CO_2 a 37 °C (Heraeus, Alemanha). O meio de cultura foi mudado de acordo com o crescimento da linha celular, diariamente ou a cada dois dias. A cada

fase de crescimento, para manutenção das culturas celulares, o meio de cultura foi removido lavando-se as células com PBS (pH 7.2). As células foram incubadas, durante 5 min, com 1 mL de tripsina-EDTA. Para inativar a tripsina e passar as células para um novo frasco, adicionaram-se 3 mL de DMEM. As células foram transferidas para outro frasco de cultura, adicionando-se mais meio para crescimento da cultura para contagem de células e determinação de viabilidade.

2.4.4.2. Estudos de internalização e captação celular

As células OVCAR8 foram semeadas, de véspera, com uma concentração de 20000 células por poço, em placas com 24 poços. As células foram incubadas a 37 °C durante o período de 5 min até 4 h, com aproximadamente 5 µCi de radioligando por placa, 20000 cpm/poço (0.5 mL de meio). Após cada tempo de incubação, o radioligando ligado à membrana celular foi removido através de dois passos de lavagem ácida (glicina 50 mM, HCl / NaCl 100 mM, pH 2.8) à temperatura ambiente por 4 min. O pH foi neutralizado com PBS frio com 0.2 % de BSA e, posteriormente, as células foram lisadas com NaOH 1 M por 10 min a 37 ° C para determinar o radioligando internalizado. Recolheram-se os lisados celulares e mediu-se a sua atividade num contador γ (Berthold, LB2111, Alemanha). Para cada tempo de incubação realizaram-se quatro replicados.

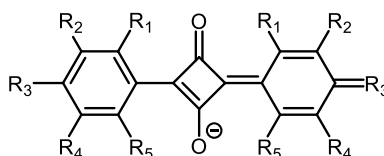
3. Resultados e discussão

3.1. Síntese de esquaraínas

A síntese de esquaraínas do tipo A está reportada na literatura através da reação de condensação entre fenóis e ácido esquárico [55,60]. Numa primeira fase deste trabalho explorou-se o uso do fenol floroglucinol, tendo-se obtido a esquaraína **1**.

De modo a criar uma pequena biblioteca de equaraínas do tipo A, foram testados diferentes fenóis, e derivados de flavonas, seguindo o mesmo protocolo. A Tabela 3.1 resume os ensaios realizados neste estudo. Como se pode verificar, apenas o floroglucinol e o ácido gálico deram origem a esquaraínas desta família, produtos **1** e **2**, respetivamente. O sucesso destas reações foi comprovado por RMN. Nos restantes casos observou-se uma ausência de reatividade, tendo sido apenas recuperados os materiais de partida.

Tabela 3.1. Síntese de esquaraínas do tipo A.

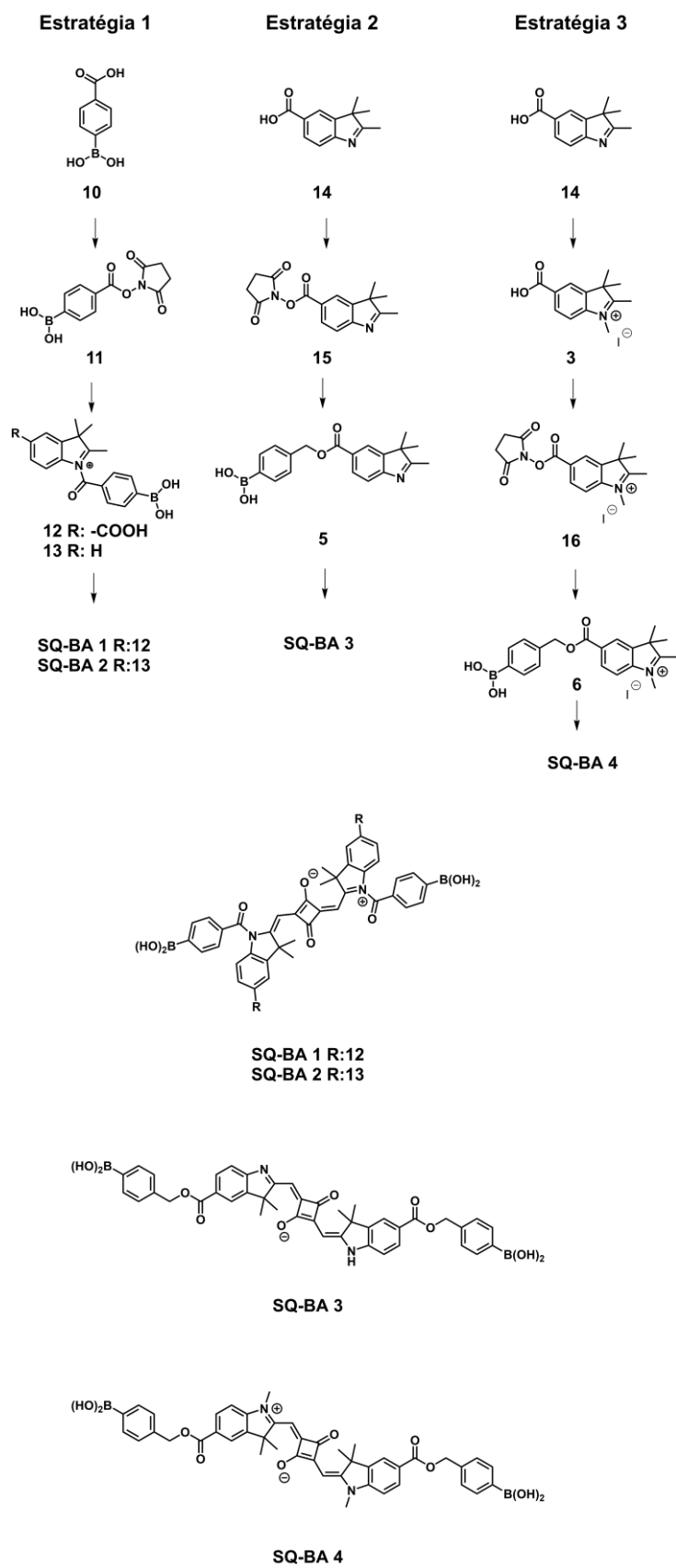


Reagente	R	Esquaraína
Floroglucinol	R ₁ , R ₃ , R ₅ = OH; R ₂ , R ₄ = H	1
Pirogalol	R ₁ , R ₅ , R ₆ = OH; R ₂ , R ₃ , R ₄ = H	Não reagiu
Fenol	R ₁ = OH; R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ = H	Não reagiu
Ácido gálico	R ₁ = CO ₂ H; R ₂ , R ₆ = H; R ₃ , R ₄ , R ₅ = OH	2
2,5-Dihidroxiacetofenona	R ₁ = COCH ₃ ; R ₂ , R ₄ , R ₅ = H; R ₃ , R ₆ = OH	Não reagiu
Crisina	n.a.	Não reagiu

No espetro de ¹H da esquaraína **1** observa-se um desdobramento do sinal do floroglucinol (anteriormente a 5.89 ppm) em dois singletos (6.13 ppm e 6.02 ppm, H-6' e H-2', respetivamente). O singlete a 5.86 ppm, integra para dois e corresponde aos protões adjacentes ao grupo OH (H-6 e H-2). A esquaraína **2** foi obtida como uma mistura inseparável com material de partida, facto que foi confirmado pela integração dos protões da zona aromática.

Como a preparação das esquaraínas do tipo A não se mostrou eficaz, observando-se uma baixa reatividade dos reagentes usados na presença do ácido esquárico, investigou-se uma modificação do protocolo um derivado do ácido esquárico, o dietil esquarato. Este derivado apresenta um melhor grupo de saída (etóxido) e, conseqüentemente, uma maior reatividade. [62] No entanto, mesmo usando este derivado não foi possível obter as esquaraínas desejadas, o que provavelmente indica que as condições do protocolo terão que ser otimizadas (*e.g.* uso de catalisador).

Uma vez que as esquaraínas do tipo A apresentaram limitações na sua síntese tornou-se necessário uma nova abordagem de síntese. Nesse sentido, foram testadas algumas vias sintéticas no sentido de obter esquaraínas do tipo B. O Esquema 3.1 apresenta as estratégias investigadas neste trabalho.



Esquema 3.1 Esquema representativo das vias sintéticas investigadas na síntese de SQ-BA.

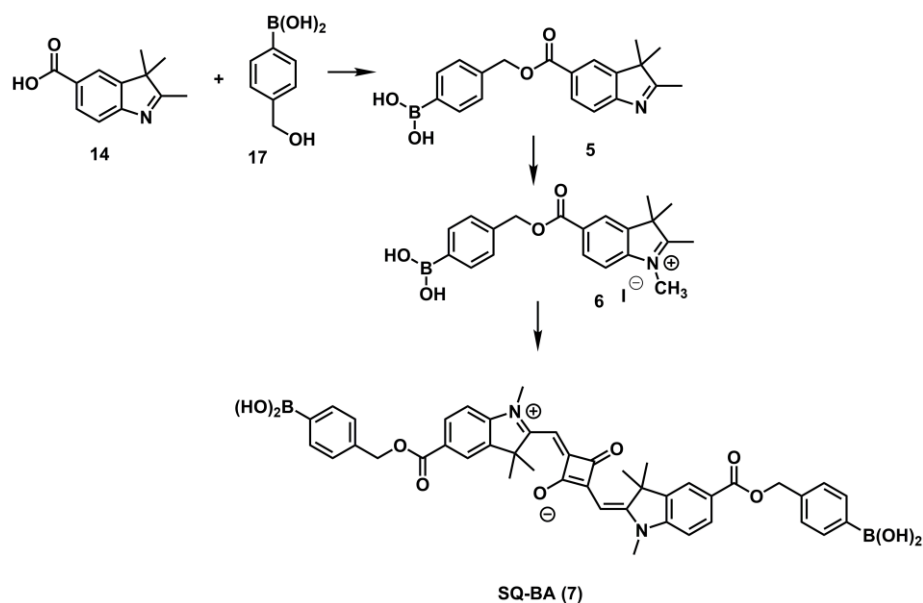
Na primeira estratégia sintética o material de partida selecionado foi o ácido 4-carboxifenil borónico (**10**). De modo a tornar este reagente mais reativo, procedeu-se primeiramente à síntese do éster ativado correspondente (**11**). A formação do éster ativado consiste numa reação entre o ácido carboxílico e um derivado de carbodiimida, EDC ou DCC, seguida da adição da *N*-hidroxi-succinimida [48,62]. Este derivado foi usado no passo seguinte, onde se fez reagir com um derivado da indolenina (**12** e **13**). No entanto, desta reação não resultou o produto desejado, pelo que se seguiu outra via.

Numa segunda abordagem sintética, optou-se pela síntese do éster ativado de um derivado da indolenina (**15**), prosseguindo-se depois para a reação com o derivado do ácido borónico. Esta reação originou dois produtos maioritários com FRs muito próximos e de difícil separação (controlo por TLC, AcOEt/Hex 8:2). Após isolamento desta mistura verificou-se por ¹H RMN, que se tratava maioritariamente de material de partida e outros intermediários que não correspondiam ao produto desejado e que não foi possível identificar.

Em seguida foi investigada uma terceira estratégia, na qual foi usado um derivado de indolenina *N*-metilado (**3**), seguindo um procedimento da literatura. [56,57,61] Nesse sentido, fez-se reagir o ácido 2,3,3-trimetil-3H-indole-5-carboxílico (**14**) com o iodometano, ocorrendo a metilação do átomo de azoto. Após a reação de *N*-metilação avançou-se para a formação do éster ativado correspondente (**16**). Contudo, com este intermediário também não foi possível obter o produto desejado **6**.

Ainda na sequência desta estratégia, foi testada a reação de condensação entre o derivado **3** e o ácido esquárico. [57,58] Dessa condensação obteve-se com sucesso a esquaraína correspondente (**4**). Tendo sido estabelecidas as condições experimentais para a obtenção das esquaraínas do tipo B usou-se esta estratégia para sintetizar as esquaraínas desenhada para este trabalho.

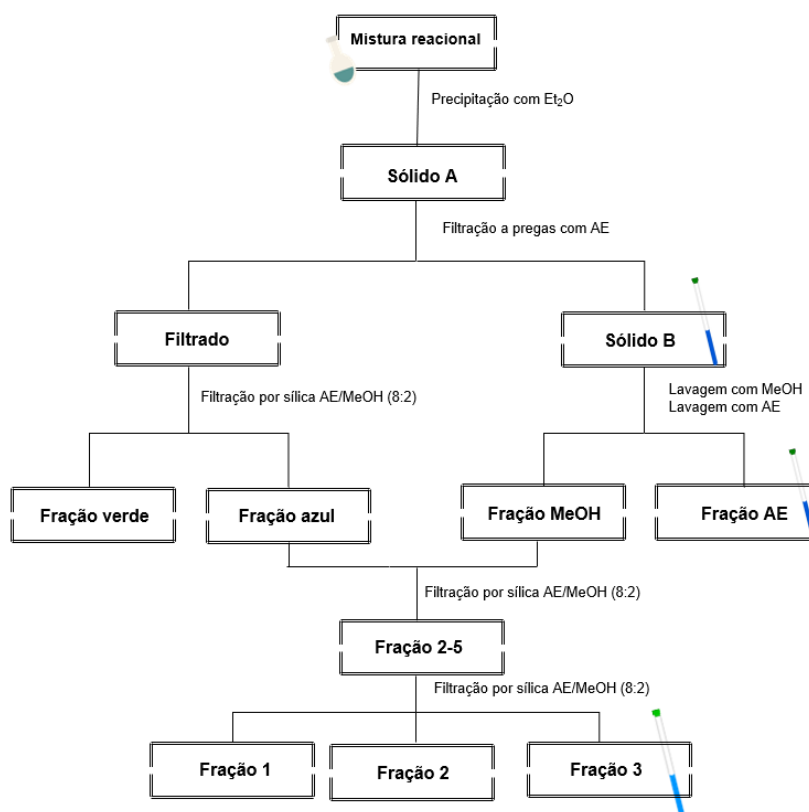
Sendo um dos grandes problemas das vias sintéticas descritas anteriormente a dificuldade em isolar o éster ativado, tentou-se uma abordagem diferente. Essa abordagem passou pela formação do éster *in situ*. Para tal seguiu-se um protocolo da literatura, que consiste no acoplamento do álcool do ácido carboxílico com o ácido do derivado da indolenina usando DCC e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador.[58] Procedeu-se então à esterificação do produto **14**, obtendo assim o intermediário **5**, seguindo-se a *N*-metilação para obter **6** e por fim a condensação com o ácido esquárico para obter a esquaraína SQ-BA (**7**), tal como pretendido (Esquema 3.2).



Esquema 3.2. Via sintética para a síntese da esquaraína SQ-BA: i) CH_2Cl_2 , DCC, DMAP; ii) CH_3I , CH_3CN ; iii) ácido esquárico, quinolina, tolueno/isopropanol.

Os intermediários e o produto final foram caracterizados por RMN. No espectro de ^1H do intermediário **5**, verifica-se a presença de um singlete a 5.34 ppm correspondente aos prótons H-13. O desvio químico associado a estes prótons indica a formação do éster, uma vez que no material de partida, o ácido 4-hidroximetilfenil borónico, os prótons H-13 aparecem com um desvio por volta de 4 ppm. No entanto, observou-se também uma pequena contaminação de indole de partida e de DMAP, que foi confirmada pelo excesso de prótons característicos destes reagentes, na zona aromática. Essa contaminação, verificou-se também nos passos seguintes, tendo sido removida na purificação do produto final. O derivado *N*-metilado (**6**) apresentou como sinal diagnóstico um singlete com desvio 4.06 ppm (H-20), característico de grupos alquilo ligados a um heteroátomo, neste caso um azoto.

O último passo da síntese, a condensação de duas moléculas de **6** com o ácido esquárico, deu origem à esquaraína **7**, tal como pretendido. No processo de isolamento da esquaraína **7**, verificou-se também a formação de dois produtos laterais, resultantes da hidrólise das ligações éster, que foram isolados e caracterizados. O Esquema 3.3 resume o processo de purificação da esquaraína **7**.



Esquema 3.3. Esquema geral da purificação da esquaraína SQ-BA (7).

A esquaraína SQ-BA foi caracterizada por RMN de ¹H (Figura 3.1). No espectro obtido observam-se os sinais característicos deste tipo de moléculas, nomeadamente um singlete a 5.87 ppm correspondente a H-12, resultante da reação de condensação com o ácido esquárico. Outro sinal que permitiu confirmar a estrutura do produto foi a presença de um singlete a 5.37 ppm, correspondente aos quatro prótons (H-13) dos grupos metileno da unidade de ácido fenilborónico.

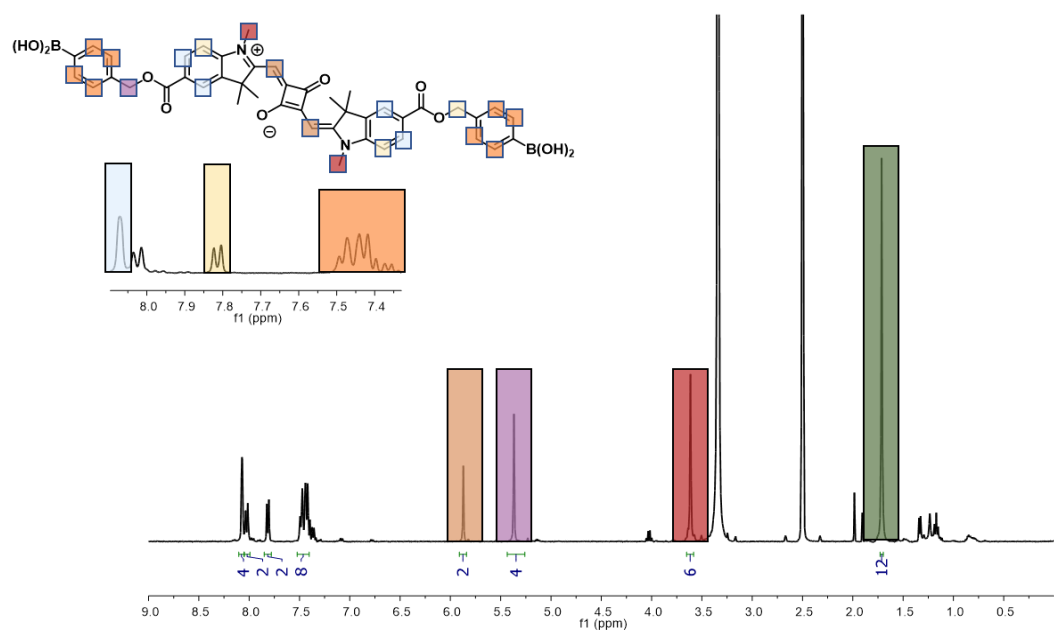


Figura 3. 1. Espectro de RMN de ^1H da esquaraína SQ-BA em $\text{DMSO-}d_6$.

Na Figura 3.2 estão representados os espectros de RMN de ^1H dos subprodutos obtidos durante a purificação da SQ-BA. Em ambos é possível observar os sinais característicos do produto de condensação entre o ácido esquárico e o derivado de indolenina. A diferença entre ambos reside na integração dos sinais da zona aromática e do grupo metileno, correspondentes à unidade contendo o ácido fenilborónico.

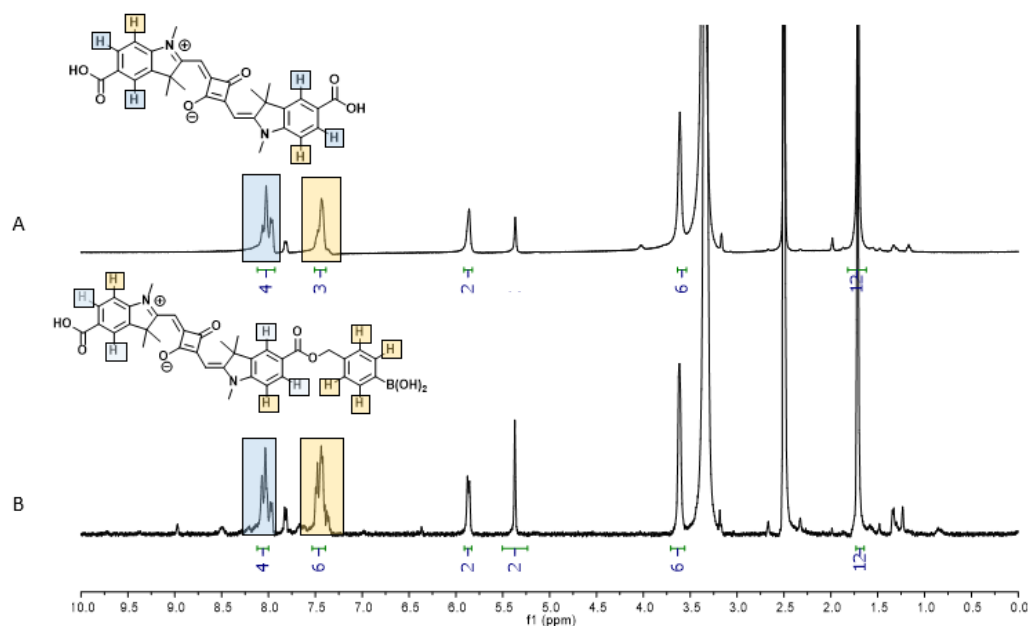


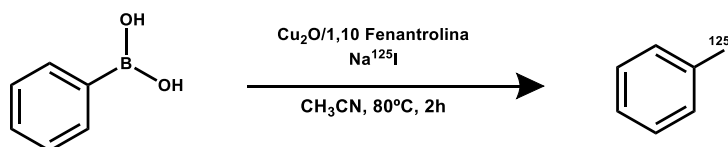
Figura 3.2. Espectros de RMN de ^1H dos produtos de hidrólise de SQ-BA em $\text{DMSO-}d_6$. (A) produto di-hidrolisado (B) produto mono-hidrolisado.

3.2. Marcações radioisotópicas

3.2.1. Marcação de SQ-BA com iodo-125

Antes de serem testadas as condições de radioiodação na sonda SQ-BA, usou-se primeiramente uma molécula modelo, o ácido fenilborónico, por ser uma molécula pequena e amplamente usada como molécula precursora para este tipo de marcações.

Partindo das condições descritas em [48], representadas no Esquema 3.4, foram analisadas algumas variáveis essenciais para a reação em estudo, tendo sido feito o controlo da cinética reacional por HPLC. Numa primeira fase, à temperatura ambiente, não se observou nenhum pico no tempo de retenção do ^{125}I odobenzeno, pelo que foi necessário aquecer a mistura a 80 °C. Nestas condições, foi possível observar um pico a 9.39 minutos, e com uma área significativa. Apesar dos resultados serem coerentes com a literatura, o pico residual do iodeto, com um tempo de retenção por volta dos 2 minutos, apresentou uma intensidade relativamente elevada, não permitindo determinar o rendimento da marcação. De modo a otimizar o processo foram adicionados à mistura cerca de 150 μL de PBA (4 μmol) aumentando assim a concentração de precursor na mistura reacional, o que permitiu a diminuição do pico residual do iodeto e o aumento do pico correspondente ao ^{125}I odobenzeno.



Esquema 3.4. Esquema reacional da síntese do 125-iodobenzeno. [48]

Após esta otimização, obteve-se a reação de radioiodação do composto modelo de modo eficaz, observando-se um pico com um tempo de retenção de 9.13 minutos, após uma hora de reação a 80 °C. O cromatograma obtido na análise da mistura reacional está representado na Figura 3.3.

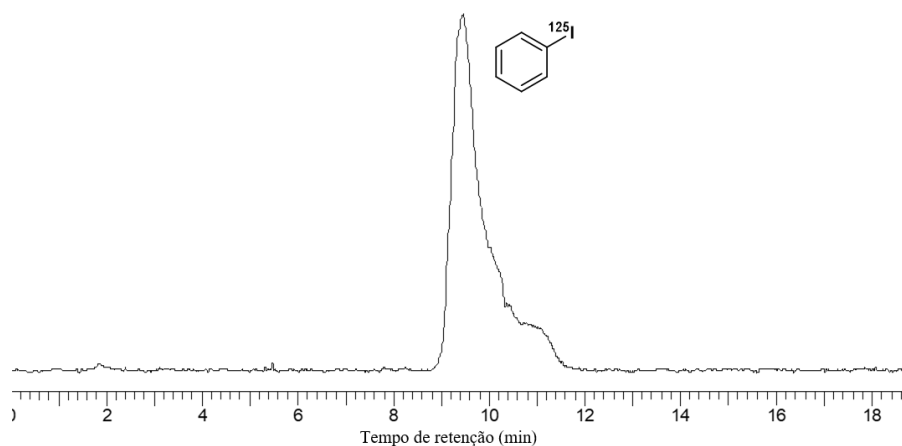


Figura 3.3. Cromatograma de HPLC do 125-iodobenzeno, produto da radioiodação do ácido fenilborónico (CH₃CN/0.1% TFA 60:40, tr= 9.13 min).

Para obter o perfil cromatográfico da esquaraína em estudo foi necessário otimizar o gradiente de eluição. [62] Embora o comprimento de onda adequado para a análise desta sonda seja na região dos 650 nm ($\lambda_{\text{max}} = 658$ nm), não foi possível trabalhar nesta região devido à inexistência de um detetor nesta gama de comprimentos de onda. Assim, a detecção foi efetuada no intervalo de comprimentos de onda da lâmpada usada (D2) na região 250–360 nm. No entanto, existe um largo espectro de moléculas que absorvem nesta região, o que diminui a sensibilidade da análise. O comprimento de onda selecionado para este estudo foi 280 nm.

Após a otimização dos parâmetros necessários para a análise por HPLC, foi obtido o cromatograma do composto em estudo, onde é possível observar a presença de SQ-BA com um tempo de retenção de 8.66 minutos (Figura 3.4). Também é possível observar outros dois picos menos intensos, a 2.37 e 12.16 minutos. O primeiro, poderá corresponder ao iodo residual na mistura, uma vez que no passo reacional de *N*-metilação foi usado o iodometano. O segundo

pico, menos intenso, pode indicar a presença do produto de isomerização da SQ-BA, através da alteração da configuração da ligação dupla. Na impossibilidade de purificar estas frações, avançou-se para a reação de iodação com ^{125}I , tendo este perfil como padrão do precursor.

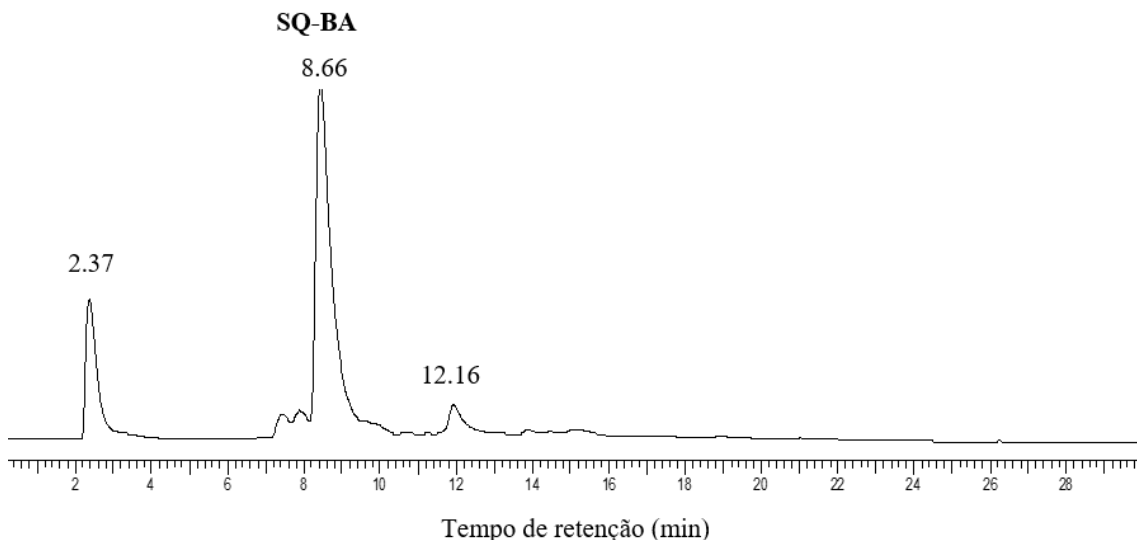


Figura 3.4. Cromatograma de HPLC de SQ-BA ($\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA em gradiente 5-100%, seguido de CH_3CN em gradiente 100-5%, $t_r = 8.66$ min).

O primeiro método de radioiodação testado para a sonda SQ-BA, foi o método usado no composto modelo. Mantendo as concentrações, o volume da solução de ligando $\text{Cu}_2\text{O}/1,10$ -fenantrolina e o volume de Na^{125}I , variou-se apenas a quantidade de precursor inicial, sendo que nesta fase foram adicionados 150 μL de uma solução de SQ-BA, correspondendo a 1.15 μmol .

Após a análise dos cromatogramas obtidos verificou-se que não ocorreu a marcação da esquaraína SQ-BA, uma vez que se observou apenas o pico correspondente ao iodeto usado na marcação, com um tempo de retenção de 2.5 minutos. Observou-se também que o precursor não sofreu nenhuma transformação química visível no perfil de HPLC dado que os picos característicos do padrão se mantiveram.

Apesar dos estudos de otimização para o composto modelo terem conduzidos aos resultados expectáveis, as condições definidas não se mostraram viáveis para a marcação da SQ-BA. Um dos fatores que poderá explicar esta ausência de reatividade é a quantidade de Cu_2O e de precursor usada, uma vez que não foram avaliadas nenhuma alteração destas variáveis. Como grande parte do trabalho desenvolvido no âmbito da radiomarkação de ácidos borônicos incide sobre este método, seria de ponderar uma afinação destas condições reacionais.

Na sequência destes resultados, foi então investigado um novo procedimento experimental, reportado na literatura, que passava por uma radioiodação mediada por agentes

oxidantes: cloroamina-T (CAT) e iodogênio (Figura 3.5). [47,62] Os resultados obtidos com este método mostraram-se reprodutíveis.

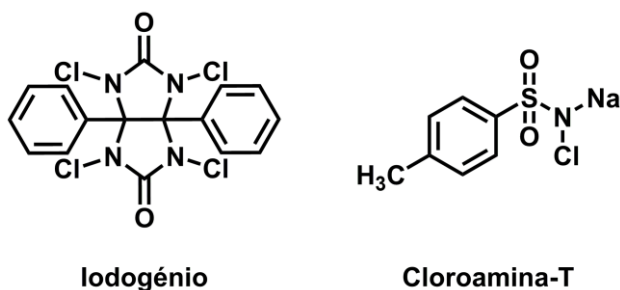


Figura 3.5. Estrutura química dos agentes oxidantes testados nos métodos de radioiodação de SQ-BA.

Nas experiências de radioiodação mediada por Cloroamina-T observou-se a presença de dois picos no cromatograma gama, o primeiro com um tempo de retenção de 14.91 min e o segundo com tempo de retenção de 17.65 min. Considerando que ambos correspondem a uma espécie resultante da radioiodação do precursor, pressupôs-se que um dos sinais correspondesse ao produto ^{125}I -SQ-BA.

Observou-se ainda uma alteração visível no perfil cromatográfico do precursor em ambiente reacional, contrariamente ao que foi observado no método descrito anteriormente para a iodação mediada por Cu(I). Neste caso, e tendo sempre como referência o padrão do precursor, o pico característico por volta dos 8 minutos diminuiu, aumentando de maneira quase proporcional o pico a 12 minutos. Para além destes, foram visíveis outros picos com tempos de retenção de aproximadamente de 14 min (Figuras 3.6(A) e (B)).

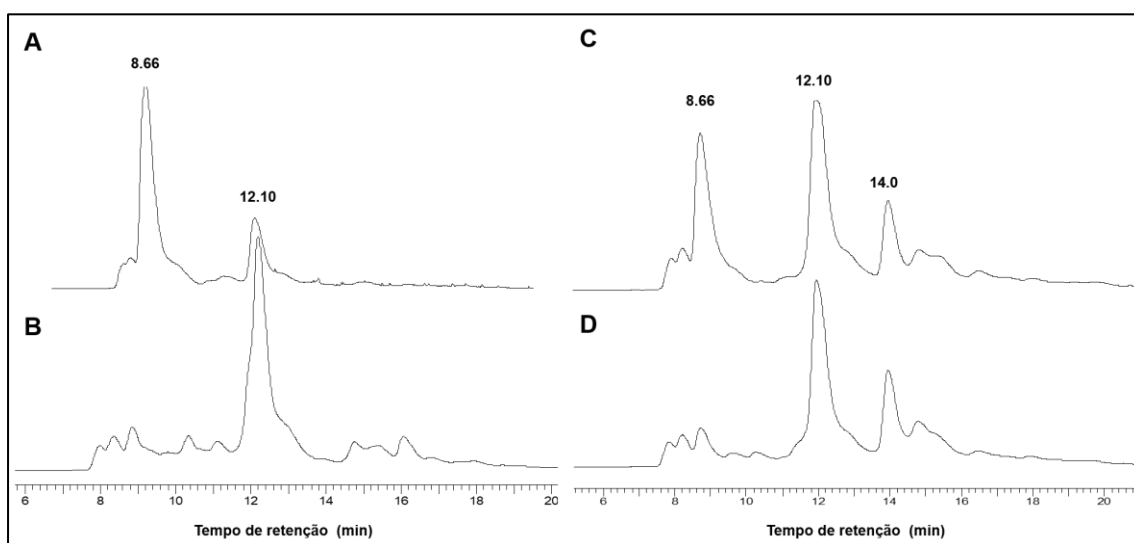


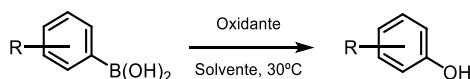
Figura 3.6. Cronatogramas (UV) da radioiodação da SQ-BA: A) usando cloroamina-T, 30 min; B) usando cloroamina-T, 2 h; C) usando iodogênio, 5 min e D) usando iodogênio, 2 h.

Note-se que na impossibilidade de sintetizar o derivado iodado de SQ-BA (marcação a frio), por questões de limite temporal deste trabalho, e deste modo usá-lo como padrão nestas mesmas condições, não foi possível identificar todas as espécies radioiodadas obtidas através deste método.

No processo de radioiodação mediado por iodogénio, usaram-se tubos revestidos deste agente, interrompendo-se a reação transferindo a mistura reacional para outro frasco. Depois da marcação, a mistura reacional foi analisada por HPLC. Na primeira mistura reacional analisada, após 5 minutos de reação, não foi possível observar qualquer composto radioiodado, tendo-se observado apenas o pico correspondente ao iodo (I_2). No perfil do precursor verificaram-se alguns picos de interesse. A principal particularidade observada foi o aumento do pico aos 12 minutos apesar de se terem observado também outros picos menos intensos aos 14 e 15 minutos. (Figura 3.6 (C)).

Numa segunda análise o pico correspondente ao iodo manteve-se, não se tendo observado qualquer outro pico relativo à espécie radioiodada. Aqui, o perfil do precursor alterou-se, uma vez que, o pico a 8 minutos diminuiu drasticamente de intensidade, enquanto que o de 12 minutos aumentou (Figura 3.6 (D)). A ausência de produto radioiodado pode ser explicada pela quantidade de iodogénio usada, cerca de 100 μ g, sendo necessário otimizar esta quantidade em trabalho futuro.

Estes resultados quando comparados com o método de marcação anterior mostram algumas semelhanças. Comparando os perfis de HPLC em ambos os métodos, verificou-se um comportamento do precursor idêntico. Na radioiodação mediada por Cu(I) não se observaram quaisquer alterações no perfil do precursor a iodar, embora as condições reacionais nesse método não terem sido otimizadas. Tendo em consideração este facto, e os resultados obtidos na radioiodação por agentes oxidantes, tornou-se necessário compreender de que forma estes agentes alteravam a estrutura do precursor e de que forma é que essa alteração promovia a marcação. Wagh e colaboradores, em 2017, mostraram que na presença de agentes oxidantes, os ácidos fenilborónicos podem ser oxidados ao fenóis correspondentes, como mostra o Esquema 3.5. [65]

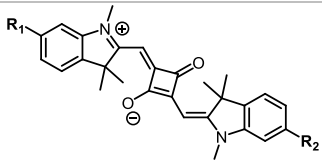
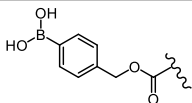
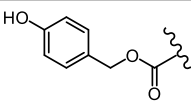
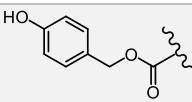
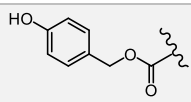
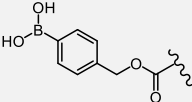
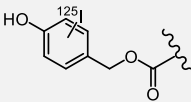
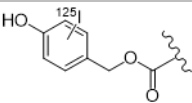
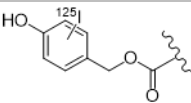


Esquema 3.5. Esquema geral da reação de oxidação de ácidos fenilborónico a fenóis.

No caso da esquaraína SQ-BA, contendo duas unidades de ácido fenilborónico, é expectável que esta reação possa também ocorrer. Deste modo podemos postular que a via oxidativa poderá conduzir à formação de duas espécies, uma com apenas um grupo borónico oxidado e outra com os dois grupos borónicos oxidados. Se traduzirmos estas possíveis estruturas em tempos de

retenção, verificamos que a espécie mono-oxidada terá um tempo de retenção superior ao de SQ-BA, embora inferior ao da espécie di-oxidada (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Tempos de retenção dos derivados oxidados de SQ-BA e dos produtos radioativos correspondentes.

Derivado			Tempo de retenção (min)
	R ₁	R ₂	
Mono-oxidado			12.10
Di-oxidado			14.10
Radiomarcacão com Na¹²⁵I			
Mono-iodado			14.91
Di-iodado			17.61

Desta forma é possível correlacionar a presença destes subprodutos com os tempos de retenção obtidos na análise do precursor, assim como no perfil das espécies radioativas. Tendo em consideração a lipofília conferida pelo átomo de iodo, pressupõe-se que o produto radioativo com um tempo de retenção 14.91 minutos corresponda ao produto mono-iodado e que o produto com tempo de retenção 17.65 minutos seja referente ao produto di-iodado (Figura 3.7).

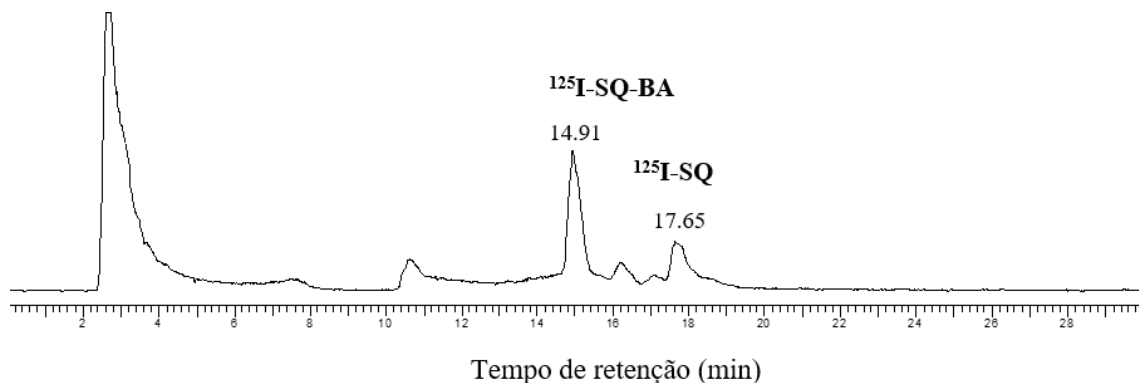


Figura 3.7. Cromatograma de HPLC Gama das espécies radioativas. Estão assinalados os picos correspondentes a $^{125}\text{I-SQ-BA}$ ($t_r = 14.91$ min) e $^{125}\text{I-SQ}$ ($t_r = 17.65$ min).

3.2.2. Marcação de $\text{PURE}_{\text{G4-FA}}$ com tecnécio- $^{99\text{m}}$

Para avaliar a internalização/captação celular do dendrímero PURE de quarta geração funcionalizado com ácido fólico ($\text{PURE}_{\text{G4-FA}}$), procedeu-se à sua marcação usando o precursor $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$.

Numa primeira fase optimizou-se o processo de marcação usando como precursor o dendrímero não funcionalizado (PURE_{G4}). Depois de optimizadas as condições de radiomarkação obteve-se o produto $^{99\text{m}}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e avaliou-se a sua estabilidade em PBS. Num ensaio preliminar de radiomarkação verificou-se que esta ocorria de forma direta, sem haver a necessidade de usar qualquer ligando para efetuar a coordenação do radioisótopo. Este resultado surpreendente reveste-se da maior importância dado que permite realizar a radiomarkação de forma simples e rápida, evitando a síntese de ligandos e posterior ancoragem.

De facto, os dendrímeros PURE apresentam na sua superfície grupos amina cuja estrutura é semelhante à dos ligandos usados para fazer radiomarcações isotópicas. Este mecanismo de ligação deverá ser semelhante ao que ocorre na presença de um agente quelante, havendo substituição das moléculas de água pelos três átomos de azoto (Figura 3.8).

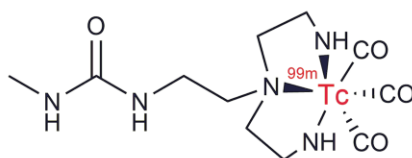


Figura 3.8. Esquema representativo da possível coordenação de $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com os grupos terminais de PURE_{G4}.

A radiomarcagem controlo foi testada em condições com pH 6 e pH 7 tendo-se obtido rendimentos de marcação de 98% e 91%, respetivamente. Optou-se pelo uso de condições a pH 6, uma vez que está descrito que para pHs superiores a 6 pode ocorrer a clivagem da amina terciária responsável pela coordenação do metal. [23] O controlo do produto marcado e das espécies precursoras foi feito através de iTLC-SG. Numa primeira etapa avaliou-se o perfil das espécies precursoras da marcação em 100% de metiletilcetona. Em ambas obtiveram-se fatores de retenção muito próximos, 0.96 para $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e 1 para $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (Figura 3.9).

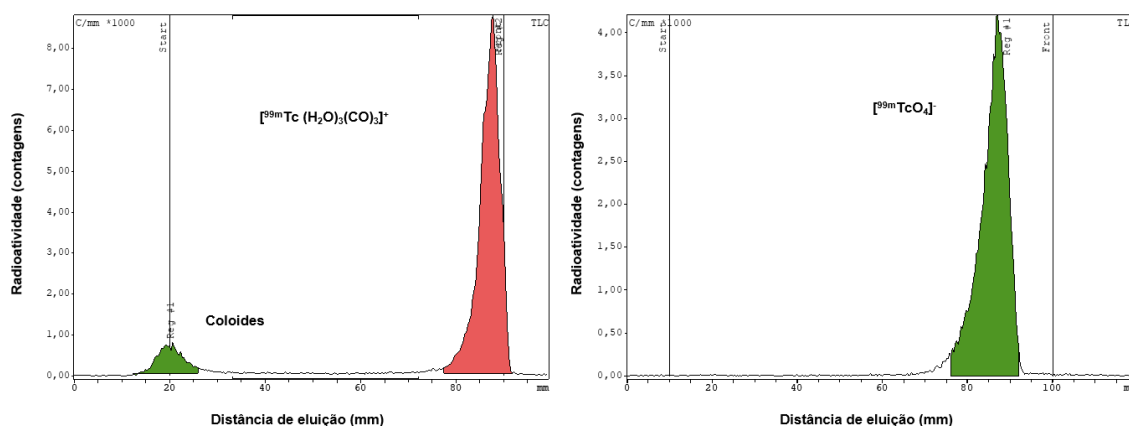


Figura 3.9. iTLC-SG das espécies $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (esquerda) e $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (direita), realizadas em metiletilcetona.

Com base nos dados obtidos por iTLC-SG, analisou-se o perfil de ^{99m}Tc -PURE_{G4} também em metiletilcetona, verificando-se um fator de retenção igual a zero, como se pode observar na Figura 3.10. Se considerarmos o peso molecular do dendrímero em estudo, concluímos que o resultado obtido está de acordo com o esperado.

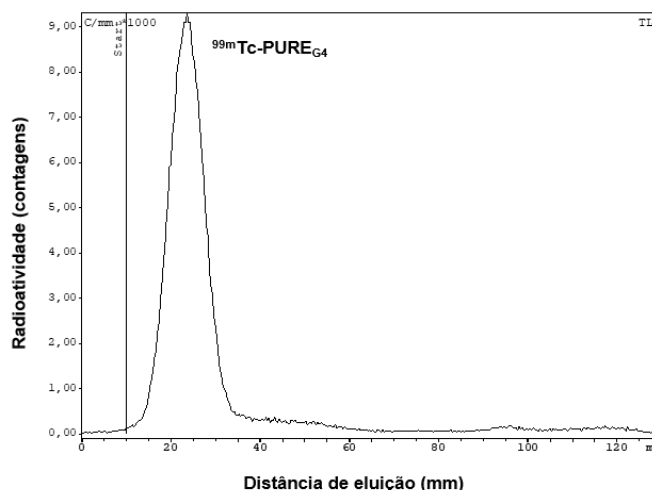


Figura 3.10. iTLC-SG do produto $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ em 100% metiletilcetona.

No entanto, apesar de não se terem observado vestígios de qualquer espécie hidrofílica precursora com fator de retenção de 1, foi necessário otimizar um método de purificação que garantisse a eliminação de quaisquer outras espécies radioativas com o fator de retenção igual ao do produto radioativo de interesse. Assim, procedeu-se à purificação da mistura através de filtração, usando numa primeira fase, filtros Amicon® 10K. No entanto, uma vez que o peso molecular do PURE_{G4} é cerca de 8 KDa, concluiu-se que estes filtros não eram indicados. Um outro fator que contribuiu para a exclusão destes filtros foi o valor de atividade associada à fração do filtrado após a centrifugação, que foi cerca de metade da atividade total logo após a marcação (0.704 mCi). De forma a otimizar este método, foram testados filtros Amicon® 3K. Nesta fase, determinou-se a atividade recuperada após a filtração, através da Fórmula 1, sendo a atividade total a soma da atividade da fração do filtrado com a atividade do concentrado. Note-se que, para a determinação deste último valor é necessário ter em consideração a quantidade de produto que fica adsorvido no filtro. A atividade de recuperação conseguida usando este filtro foi de 72%.

$$\% \text{ Atividade recuperada} = \frac{\text{Atividade do concentrado}}{\text{Atividade total}} \times 100 \quad (1)$$

Otimizados os parâmetros de radiomarkação avaliou-se a estabilidade do dendrímero marcado. Como descrito na parte experimental, essa estabilidade foi avaliada colocando o produto marcado a 37 °C, em PBS, durante algumas horas. O controlo da estabilidade foi feito com o mesmo sistema de iTLC-SG usado anteriormente, 2 e 24 horas depois. Analisando os

cromatogramas obtidos, concluiu-se que o dendrímero não funcionalizado marcado radioativamente se mantém estável ao longo do tempo. Contudo, verifica-se também uma diminuição da atividade da amostra, devido ao tempo de desintegração de seis horas associado a este radioisótopo (Figura 3.11).

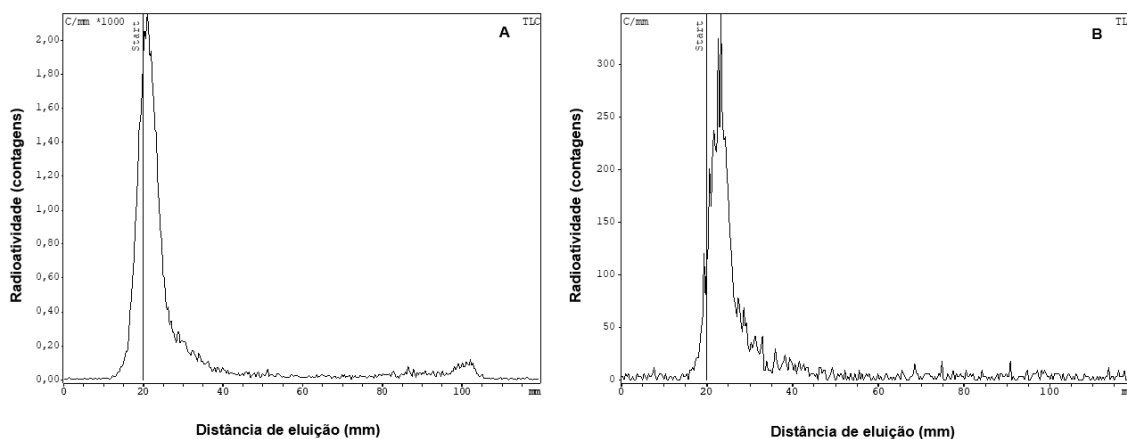


Figura 3.11. Controlo da estabilidade de $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ em PBS a 36 °C, durante (A) 2 horas e (B) 24 horas usando iTLC-SG em metiletilcetona.

A radiomarcção do dendrímero funcionalizado, $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$, seguiu, no geral, as condições otimizadas para $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$. Primeiramente, foram testadas todas as condições anteriores, de modo a perceber se o rendimento de marcação era idêntico ao do $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$, marcado a pH 6. A eficácia de marcação foi também avaliada por iTLC-SG (100% metiletilcetona), tendo-se obtido um rendimento de marcação de cerca de 100%. Na Figura 3.12 estão representados os cromatogramas de iTLC-SG do produto radioativo antes e depois da purificação. Na amostra não purificada observou-se uma pequena percentagem de precursor $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, o qual foi eliminado no passo de purificação.

O processo de purificação seguiu também os mesmo parâmetros, determinando-se depois a atividade recuperada com um valor de 44%, o que de certa maneira contrariou os resultados observados por iTLC-SG. Analisando os valores de atividades das frações do filtrado e do concentrado, verificou-se que esse valor é superior na primeira fração, contrariando o que foi anteriormente pressuposto face à filtração usando os filtros Amicon® 3K. Um dos fatores que poderá contribuir para este resultado é a velocidade de rotação usada que, por ser elevada poderá promover a passagem dos materiais radiomarcados para o filtrado, embora o seu peso molecular não preveja esta permeação. Há também que considerar o facto de os dendrímeros possuírem uma geometria esférica, a qual poderá, contrariamente ao que acontece com polímeros lineares, facilitar a permeação. Contudo, os resultados obtidos são altamente

promissores. Fizeram-se igualmente estudos no sentido de efetuar a radiomarcagem do precursor a pH 4, mas sem sucesso.

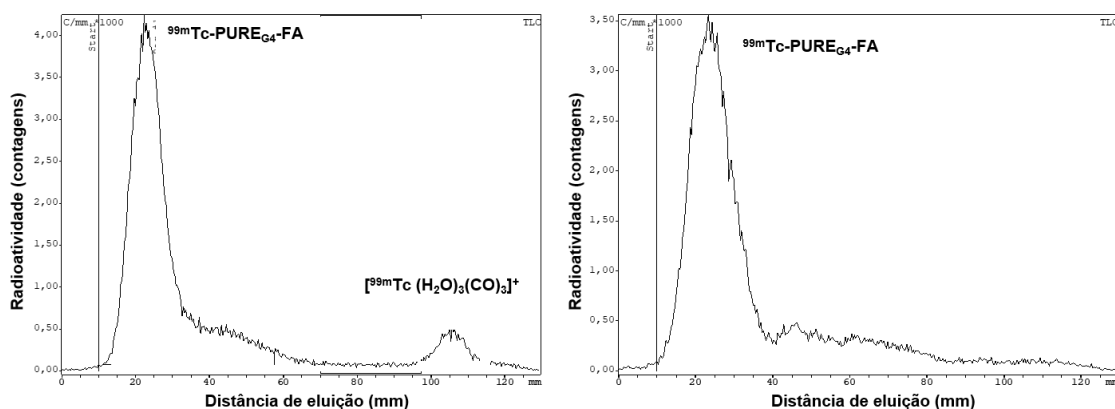


Figura 3.12. iTLC-SG de ^{99m}Tc -PURE_{G4}-FA antes (esquerda) a após (direita) purificação (Amicon®3K, 12 000 rpm).

A estabilidade de ^{99m}Tc -PURE_{G4}-FA foi avaliada nos meios de cultura DMEM e RPMI com (0.2%) e sem BSA. O controlo também foi feito por iTLC-SG em 100% metiletilcetona, onde se observou que após 16 horas de incubação a 37 °C o produto marcado apresentava uma estabilidade significativa.

Tendo em consideração os rendimentos de purificação (atividade recuperada) obtidos para o ^{99m}Tc -PURE_{G4}-FA e para o dendrímero PURE_{G4} (controlo), avaliaram-se os perfis dos ligandos antes e depois da radiomarcagem numa tentativa de compreender melhor o comportamento destes no processo de purificação por filtração.

Esta avaliação teve por base uma metodologia desenvolvida por Islam e colaboradores em 2005, na qual foi estudada a separação das diferentes gerações de dendrímeros PAMAM, quer por cromatografia de exclusão molecular, quer por cromatografia de fase reversa. [66] Assim, para os materiais em estudo, recorreu-se ao HPLC usando uma coluna de fase reversa, C18, cuja constituição assenta no princípio da separação por polaridade. Neste tipo de coluna, a fase estacionária é hidrofóbica devido às longas cadeias alifáticas de 18 átomos de carbono e a eluição começa com um solvente polar, que por afinidade separa primeiro os analitos de maior polaridade. Durante esta separação, o volume do solvente de menor polaridade aumenta, permitindo a separação dos analitos menos polares ou lipofílicos. Usando esta coluna obtiveram-se os perfis de PURE_{G4} e PURE_{G4}-FA (Figura 3.13).

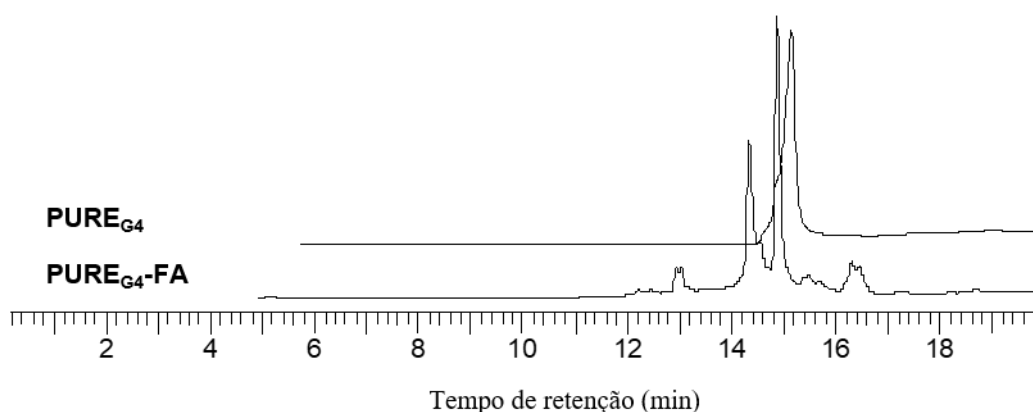


Figura 3.13. Cromatogramas de HPLC para PURE_{G4} (em cima, $t_r = 15.48$ min) e para $\text{PURE}_{\text{G4-FA}}$ (em baixo, $t_r = 14.33$ e 14.87 min).

Atendendo às propriedades dos dendrímeros analisados, seria de esperar que PURE_{G4} apresentasse um tempo de retenção inferior ao dendrímero funcionalizado com ácido fólico, uma vez que a funcionalização confere alguma lipofília ao polímero. No entanto isto não se verificou já que $\text{PURE}_{\text{G4-FA}}$ apresentou tempos de retenção inferiores ao dendrímero não funcionalizado. No cromatograma do $\text{PURE}_{\text{G4-FA}}$, verificou-se a presença de dois picos diferentes, resultado que poderá ser explicado pela existência de uma mistura de dendrímeros conjugados, resultantes da reação de funcionalização de PURE_{G4} com ácido fólico, podendo o produto ser uma mistura estatística de dendrímeros conjugados com uma ou duas moléculas de ácido fólico. Por RMN observou-se a existência de espécies que, em média, tinham duas unidades de ácido fólico conjugadas.

Antes de se avançar para a análise dos produtos radioativos fez-se previamente o controlo das espécies precursoras da marcação, $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ e $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Tempos de retenção das espécies precursoras usadas na radiomarkação e dendrímeros radiomarcados.

Analito	Tempo de retenção (min)
$[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$	3.97
$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$	8.52
$\text{PURE}_{\text{G4-FA}}$	14.33; 14.87
PURE_{G4}	15.48

O primeiro produto radioativo analisado foi $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$, sem qualquer purificação. No perfil obtido, observam-se alterações nos tempos de retenção e o aparecimento de dois picos. A diminuição dos tempos de retenção, embora quase insignificante, pode advir de fatores externos à análise uma vez que variações de pressão ou temperatura no sistema promovem oscilações nos tempos de eluição. Depois da purificação analisou-se de novo o produto, obtendo-se os mesmos tempos de eluição (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Resumo dos tempos de retenção dos produtos $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$, antes e depois da purificação.

Analito	Tempo de retenção (min)
$^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ não purificado	13.60; 14.00
$^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ purificado	13.90; 14.95
$^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$ não purificado	3.99; 6.93; 13.44; 13.61; 13.79; 13.90
$^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$ purificado	3.99; 6.49; 13.39; 13.57; 13.74; 13.96

Os dois picos mantiveram-se na mesma zona, com um ligeiro atraso, sendo que não era visível qualquer vestígio dos precursores. Estes resultados podem indicar que o processo de purificação não é relevante, já que PURE_{G4} tem um rendimento de marcação quantitativo, determinado pela ausência da espécie $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ no controlo por iTLC-SG.

O dendrímero conjugado com ácido fólico radiomarcado, $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$, foi também analisado da mesma forma, antes e depois da purificação. Os cromatogramas obtidos para ambas as amostras foram idênticos, sem alterações significativas nos tempos de retenção (Tabela 3.6). No entanto, observaram-se as espécies precursoras da marcação, por volta dos 4 e 7 minutos. No processo de filtração seria de esperar que ambas as espécies fossem recolhidas no filtrado, uma vez que apresentam baixo peso molecular. Estes resultados apontaram para a hipótese de ter ocorrido encapsulação dessas espécies pela cavidade hidrofóbica do dendrímero, facto que poderia explicar a presença dos picos correspondentes às moléculas precursoras $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ e $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. Uma observação que poderá sustentar esta hipótese é o facto da percentagem de atividade recuperada após a purificação ser de cerca de 50%, indicativa de que pelo menos metade da atividade inicial está no filtrado.

Sendo assim, em trabalho futuro haverá a necessidade de otimizar o processo de purificação, recorrendo a HPLC. Deste modo, será possível a recolha seletiva do pico que corresponde à espécie radiomarcada.

Os resultados obtidos na determinação do coeficiente de partição do dendrímero funcionalizado e não funcionalizado com ácido fólico, estiveram de acordo com as propriedades

desta classe de polímeros. Sabendo que se tratam de espécies altamente hidrofílicas, polares, e consequentemente, com uma solubilidade em água significativa seria de esperar que o valor do coeficiente de partição, expressado em Log(P) fosse um valor negativo. Embora sejam espécies químicas idênticas, foram obtidos diferentes valores para $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$, -1.88 e -1.56, respetivamente (Tabela 3.5). Se traduzirmos estes valores percebemos que indicam uma baixa lipofília de ambos os compostos. No dendrímero funcionalizado com folato verificou-se um aumento dessa lipofília, conferida pelas moléculas de folato à superfície.

Tabela 3.5. Valores de coeficiente de partição (LogP) para os radioligandos em estudo.

Composto radiomarcado	Log (P _{o/PBS})
$^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$	-1.88
$^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$	-1.56

3.3. Estudos de captação e internalização celular

Os ensaios de captação e internalização celular foram realizados numa linha celular do carcinoma do ovário (OVCAR8) usando os dendrímeros radiomarcados $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$ antes e depois da purificação. Os resultados obtidos foram em percentagem de captação celular por atividade total, indicando assim a atividade correspondente à internalização e captação celular.

Numa primeira etapa foram realizados os ensaios para as frações não purificadas de $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ e $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$ (Figura 3.14). A percentagem de captação celular foi superior para $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$, tendo atingido o seu valor máximo de 17.6% ao fim de 3 horas. Para $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$, o valor máximo de captação celular foi de 3.3% após 4 horas. A internalização de $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4-FA}}$ foi também inferior (0.8%), quando comparado com o valor obtido para $^{99m}\text{Tc-PURE}_{\text{G4}}$ (8.7%).

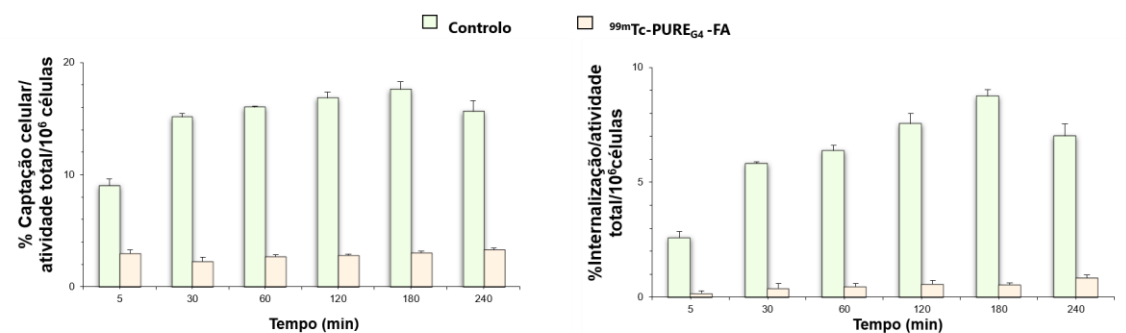


Figura 3.14. Captação celular (esquerda) e internalização celular (direita) dos dendrímeros radiomarcados não purificados.

Numa segunda fase dos ensaios celulares foram avaliadas as percentagens de internalização e captação celular das frações purificadas. Relativamente aos valores obtidos nas frações anteriores, observaram-se algumas melhorias (Figura 3.15). Os valores de captação celular mostraram-se superiores para ^{99m}Tc-PURE_{G4} (27.7% para 2 horas de ensaio) relativamente a ^{99m}Tc-PURE_{G4}-FA (9.1% para 4 horas de ensaio).

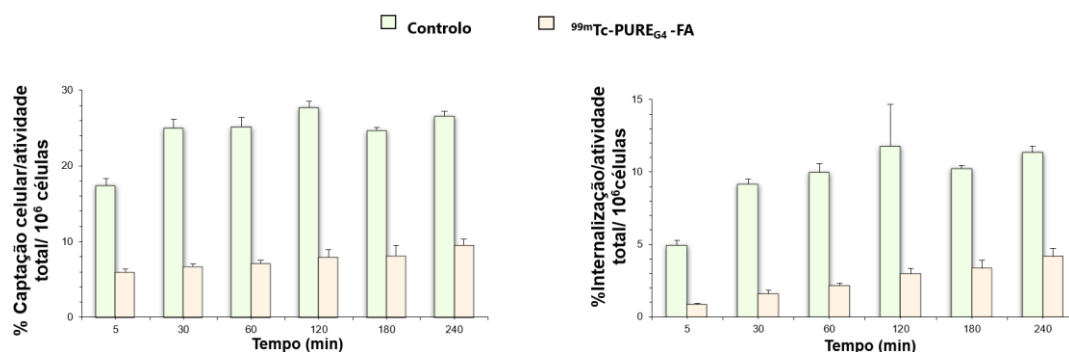


Figura 3.15. Captação celular (esquerda) e internalização celular (direita) para os dendrímeros radiomarcados purificados.

Estes resultados não corresponderam ao esperado, uma vez que o dendrímero sem ácido fólico mostrou percentagens de internalização e captação celular superiores ao dendrímero contendo o alvo para os recetores FR- α . Um dos factores que poderá ter contribuído para este resultado poderá ser o facto de os ensaios terem sido realizados usando um meio de cultura contendo ácido fólico. A existência de ácido fólico no meio, poderá ter promovido uma competição com o radioligando ^{99m}Tc-PURE_{G4}-FA, ao sítio ativo do recetor. Esta competição resultaria na saturação do recetor, que por estar em quantidade limitada na membrana fica menos disponível para a ligação com ^{99m}Tc-PURE_{G4}-FA.

4. Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho realizado teve como objetivo a investigação de novas ferramentas de diagnóstico e tratamento de cancro do ovário, uma patologia silenciosa e com baixo prognóstico em estadios avançados. Tendo por alvo proteínas de membrana glicosiladas, com elevada expressão em células cancerígenas, foi sintetizada uma sonda fluorescente com emissão na região do infravermelho próximo (SQ-BA, adequada para imagem ótica *in vivo*). Esta sonda, devido a uma funcionalização com ácidos borónicos permite o reconhecimento de sacáridos por reação seletiva com os grupos *cis*-diol vicinais. O estudo da aplicação de SQ-BA em tratamento por radioterapia, foi iniciado usando como estratégia a radiomarcagem com iodo-125 como modelo. De todos os métodos testados, conclui-se que apenas a marcação radioisotópica mediada por Cu₂O conduz a bons resultados, contudo estas condições poderão ainda ser otimizadas. No futuro, seria importante sintetizar o derivado iodado não radioativo de SQ-BA de modo a ser usado como padrão nos ensaios de radiomarcagem. Em trabalho futuro, após otimização das condições de radiomarcagem deverá ser usado o radioisótopo iodo-131 uma vez que este radioisótopo pode ser usado simultaneamente como agente de diagnóstico e terapia. Relativamente à síntese de esquaraínas, futuramente poderão ser explorados novas metodologias para preparação de derivados do tipo A, e poder ser igualmente explorada a síntese de novos derivado do tipo B, nomeadamente a funcionalização com ácidos borónicos noutras posições da molécula, explorando a influência da estereoquímica no processo de reconhecimento molecular.

Relativamente ao uso de nanoveículos conjugados com ácido fólico (dendrímeros de poliureia, PURE_{G4}-FA) para reconhecimento de recetores do folato (FR- α) foi desenvolvida uma metodologia simples a sua radiomarcagem com tecnécio-99m (^{99m}Tc-PURE_{G4}-FA), sem recurso a agentes quelantes e com elevado rendimento. A nível celular, o ^{99m}Tc-PURE_{G4}-FA foi testado preliminarmente numa linha celular do carcinoma do ovário (OVCAR8) mostrando capacidade de internalização celular. Sendo assim, conclui-se que estes novos agentes possuem um elevado potencial em teranóstica do cancro, uma vez que permitem igualmente o encapsulamento de fármacos. Num trabalho futuro, seria também interessante explorar a funcionalização destas nanopartículas com outros alvos para o reconhecimento celular, tais como os ácidos borónicos explorados neste trabalho na síntese de esquaraínas, ou outros ligandos naturais de recetores membranares. Assim, estes materiais poderiam ser usados como uma plataforma universal de nanoteranóstica do cancro.

5. Bibliografia

- [1] F. Leung, E. P. Diamandis, and V. Kulasingam, "Ovarian cancer biomarkers: Current state and future implications from high-throughput technologies", *Adv. Clin. Chem.*, **2014**, 66, 25.
- [2] R. Brett M., P. Jennifer B., S. Thomas A., "Epidemiology of ovarian cancer: a review", *Cancer Biol. Med.*, **2017**, 14, 9.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, and I. Soerjomataram, R.L.Siegel, L. A. Torre, A.Jemal, "Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries", *Ca-Cancer J. Clin.*, **2018**, 394.
- [4] S. S. Tworoger, A. L. Shafir, and S. E. Hankinson, "Ovarian cancer," *Schottenfeld Fraumeni Cancer Epidemiol. Prev. Fourth Ed.*, **2017**, 889.
- [5] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer Statistics 2017", *Ca-Cancer J. Clin.*, **2017**, 67, 7.
- [6] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W.W.Coebergh, H.Comber, D. Forman, F. Bray, "Cancer incidence and mortality patterns in Europe : Estimates for 40 countries in 2012", *Eur. J. Cancer*, **2013**, 49, 1374.
- [7] "Global Cancer Observatory " [Online] Disponivel em <http://gco.iarc.fr/today/home> - consultado em 22/02/2019.
- [8] K. M. Feeley, M. Wells, "Precursor Lesions of Ovarian Epithelial Malignancy", *Diagn. Histopathol.*, **2001**, 38, 87.
- [9] D. W. Cramer, "The Epidemiology of Endometrial and Ovarian Cancer", *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, **2012**, 26, 1.
- [10] S. C. Mok, J.Kwong, W.R.Welch, G.Samini, L.Ozbun, T.Bonome, M.J.Birrer, R.S.Berkowitz, K-K. Wong, "Etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer," *Dis. Markers*, **2007**, 23, 367.
- [11] B. R. Rao and B. J. Slotman, "Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer," *Endocr. Rev.*, **1991**, 12, 14.
- [12] S. A. Cannistra, "Cancer of the ovary ", *N. Engl. J. Med.*, **2004**, 351, 2519.
- [13] "Foundation for Women's Cancer - ovarian cancer" [Online] Disponível em: <https://www.foundationforwomenscancer.org/gynecologic-cancers/cancer-types/ovarian/>, consultado em 22/02/2019.
- [14] A. J. Cortez, P. Tudrej, K. A. Kujawa, and K. M. Lisowska, "Advances in ovarian cancer therapy," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2018**, 81, 17.
- [15] N. Scholler, N. Urban, "CA125: Ovarian", *Biomarker Med.*, **2010**, 1, 513.
- [16] V. Thakkar, P. Patel, N. Prajapati, R. Kaur, and M. Nandave, "Serum levels of glycoproteins are elevated in patients with ovarian cancer," *Indian J. Clin. Biochem.*, **2014**, 29, 345.
- [17] G. F. Whyte, R. Vilar, and R. Woscholski, "Molecular recognition with boronic acids-applications in chemical biology," *J. Chem. Biol.*, **2013**, 6, 161.
- [18] R. Saldo, M. R. Wormald, R. A. Dwek, and P. M. Rudd, "Glycosylation Changes on Serum Glycoproteins in Ovarian Cancer May Contribute to Disease Pathogenesis," *Dis. Markers*, **2008**, 25, 219.
- [19] D. H. Dube and C. R. Bertozzi, "Glycans in cancer and inflammation - Potencial for therapeutics and diagnostics", *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2005**, 4, 477.
- [20] S. S. M. Levonis, M. J. Kiefel, and T. A. Houston, "Boronolactin with divergent fluorescent response specific for free sialic acid", *Chem. Commun.*, **2009**, 2278.
- [21] J. P. Lorand, J. O. Edwards, "Polyol Complexes and Structure of Benzeneboronate", *J. Org. Chem.*, **1958**, 24, 769.
- [22] B. Pappin, M. J. Kiefel, and T. a Houston, "Boron-Carbohydrate Interactions," *Carbohydrates - Compr. Stud. Glycobiol. Glycotechnol.*, **2012**, 1.
- [23] S. Mundwiler, L. Candrea, and R. Alberto, "Selective Release of Technetium Complexes from a Solid Phase due to C – N Bond Cleavage upon Metal Coordination", *Chimia*, **2003**, 57, 193.
- [24] S. Jin, Y. Cheng, S. Reid, M. Li, B. Wang, "Carbohydrate Recognition by Boronolactins ,Small Molecules and Lectins", *Med. Res. Rev.*, **2009**, 30, 171.
- [25] X. Wu, Z. Li, X. Chen, J. S. Fossey, T. D. James, and Y. Jiang, "Selective sensing of

- saccharides using simple boronic acids and their aggregates”, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 8032.
- [26] C. Samaniego Lopez, M. A. Lago Huvelle, M. L. Uhrig, F. Coluccio Leskow, and C. C. Spagnuolo, “Recognition of saccharides in the NIR region with a novel fluorogenic boronolactin: in vitro and live cell labeling”, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 4895.
 - [27] X. Yi, F. Wang, W. Qin, X. Yang, and J. Yuan, “Near-infrared fluorescent probes in cancer imaging and therapy: an emerging field”, *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, 9, 1347.
 - [28] S. Friães, A. M. Silva, R. E. Boto, D. Ferreira, J. R. Fernandes, E. B. Souto, P. Almeida, L. F. V. Ferreira, L. V. Reis., “Synthesis, spectroscopic characterization and biological evaluation of unsymmetrical aminosquarylium cyanine dyes”, *Bioorganic Med. Chem.*, **2017**, 25, 3803.
 - [29] B. Kukrer, Engin U. Akkaya, “Red to near IR fluorescent signalling of carbohydrates”, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 9125.
 - [30] K. Ouchi., C. L. Colyer., M. Sebaiy., J. Zhou., T. Maeda., H. Nakazumi., M. Shibukawa., S. Saito., “Molecular design of boronic acid-functionalized squarylium cyanine dyes for multiple discriminant analysis of sialic acid in biological samples: Selectivity toward monosaccharides controlled by different alkyl side chain lengths,” *Anal. Chem.*, **2015**, 87, 1933.
 - [31] S. Saito, T. L. Massie, T. Maeda, H. Nakazumi, and C. L. Colyer, “A long-wavelength fluorescent squarylium cyanine dye possessing boronic acid for sensing monosaccharides and glycoproteins with high enhancement in aqueous solution”, *Sensors*, **2012**, 12, 5420.
 - [32] S. Sabharanjak and S. Mayor, “Folate receptor endocytosis and trafficking”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 1099.
 - [33] S. D. Weitman., R. H. Lark., L. R. Coney., D. W. Fort., V. Frasca., V. R. Zurawski., B.A. Kamen., “Distribution of the Folate Receptor GP38 in Normal and Malignant Cell Lines and Tissues”, *Cancer Res.*, **1992**, 52, 3396.
 - [34] Y. S. Yi, “Folate Receptor-Targeted Diagnostics and Therapeutics for Inflammatory Diseases”, *Immune Netw.*, **2016**, 16, 337.
 - [35] V. Boshnjaku., K-W., Shim., T. Tsurubuchi., S. Ichi., E. V. Szany., G. Xi., B. M. Farnell., D. G. McLone., T. Tomita., C. S. Mayanil., “Nuclear localization of folate receptor alpha: A new role as a transcription factor”, *Sci. Rep.*, **2012**, 2, 1.
 - [36] X. Zhao, H. Li, and R. J. Lee, “Targeted drug delivery via folate receptors”, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2008**, 5, 309.
 - [37] A. Cheung., H. J. Bax., D. H. Josephs., K. M. Ilieva., G. Pellizzari., J. Opzommer., J. Bloomfield., M. Fittall., A. Grigodriadis., M. Figini., S. Canevari., J. F. Spicer., A. N. Tutt., S. N. Karagiannis., “Targeting folate receptor alpha for cancer treatment,” *Oncotarget*, **2016.**, 7, 52553.
 - [38] L. Farzin, S. Sheibani, M. E. Moassesi, and M. Shamsipur, “An overview of nanoscale radionuclides and radiolabeled nanomaterials commonly used for nuclear molecular imaging and therapeutic functions,” *J. Biomed. Mat*, **2018**, 251.
 - [39] Z. Xiong, M. Shen, and X. Shi, “Dendrimer-based strategies for cancer therapy : Recents advances and future perspectives”, **2018**, 61, 1387.
 - [40] H. Ding and Y. Ma, “Role of physicochemical properties of coating ligands in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles,” *Biomaterials*, **2012**, 33, 5798.
 - [41] R. B. Restani, P. I. Morgado, M. P. Ribeiro, I. J. Correia, A. Aguiar-Ricardo, and V. D. B. Bonifácio, “Biocompatible polyurea dendrimers with pH-dependent fluorescence,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2012**, 51, 5162.
 - [42] J J. K. Willmann, N. Van Bruggen, L. M. Dinkelborg, S. S. Gambhir., “Molecular imaging in drug development”, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2018**, 7 , 591.
 - [43] K. N. Maloth, N. Velpula., S. Ugrappa., S.Kodangal., "Radioisotopes: An overview", *Int J Case Rep Images.*, **2014**, 5, 604.”
 - [44] N. Drude, L. Tienken, and F. M. Mottaghy, “Theranostic and nanotheranostic probes in nuclear medicine,” *Methods*, **2017**, 130, 14.
 - [45] S. B. Schwarz, N. Thon, K. Nikojalek, M. Niyazi, J. C. Tonn, C. Belka, F. W. Kreth,

- “Iodine-125 brachytherapy for brain tumours - a review”, *Radiation Oncology*, **2012**, 7, 30.
- [46] Perihan Unak, “Targeted tumor radiotherapy”, *Braz. arch. biol. technol.*, **2002**, 45, 97.
- [47] S. Mushtaq, J. Jeon, A. Shaheen, B. S. Jang., S. H. Park, “Critical analysis of radioiodination techniques for micro and macro organic molecules”, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2016**, 309, 859.
- [48] P. Zhang, R. Zhuang, Z. Guo, X. Su, X. Chen, and X. Zhang, “A Highly Efficient Copper-Mediated Radioiodination Approach Using Aryl Boronic Acids,” *Chem. A. Eur. J.*, **2016**, 22, 16783.
- [49] M. R. Akula, M. L. Yao, and G. W. Kabalka, “No-carrier-added radioiodination of triolborates, water-soluble complexes of boronic acids”, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2011**, 54, 132.
- [50] T. C. Wilson, G. McSweeney, S. Preshlock, S. Verhoog, M. Tredwell, T. Caily, V. Gouverneur, “Radiosynthesis of SPECT tracers: Via a copper mediated ¹²³I iodination of (hetero)aryl boron reagents,” *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 13277.
- [51] S. Webster, K. M. O’Rourke, C. Fletcher, S. L. Pimlott, A. Sutherland, and A. L. Lee, “Rapid Iododeboronation with and without Gold Catalysis: Application to Radiolabelling of Arenes,” *Chem. A. Eur. J.*, **2018**, 24, 937.
- [52] J. Correia, A. Paulo, and I. Santos, “Re and Tc Complexes with Pyrazolyl-Containing Chelators: from Coordination Chemistry to Target-Specific Delivery of Radioactivity,” *Curr. Radiopharm.*, **2009**, 2, 277.
- [53] T. L. Mindt, C. Müller, M. Melis, M. De Jong, and R. Schibli, “Click-to-Chelate’: In Vitro and In Vivo Comparison of a ^{99m}Tc(CO)₃³⁻ Labeled N (τ) -Histidine Folate Derivative with Its Isostructural Clicked 1, 2, 3-Triazole Analogue”, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 1689.
- [54] M. Song, Z. Guo, M. Gao, C. Shi, D. Xu, L. You, X. Wu, X. Su, R. Zhuang, W. Pan, T.Liu, X. Zhang, “Synthesis and preliminary evaluation of a ^{99m}Tc labeled folate PAMAM dendrimer for FR imaging”, *Chem. Biol Drug Des.*, **2017**, 89, 755.
- [55] A. Treibs, K. Jacob, “Cyclotrinethine Dyes Derived from Squaric Acid”, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **1965**, 4, 2547.
- [56] S. H. Kim and S. H. Hwang, “Electrochromic properties of functional squarylium dyes,” *Dye. Pigment.*, **1998**, 36, 139.
- [57] S. S. Pandey, T. Inoue, N. Fujikawa, Y. Yamaguchi, and S. Hayase, “Alkyl and fluoro-alkyl substituted squaraine dyes: A prospective approach towards development of novel NIR sensitizers”, *Thin Solid Films*, **2010**, 519, 1066.
- [58] S. J. Pastine, D. Okawa, B. Kessler, M. Rolandi, A. Zettl, and J. M. J. Fréchet, “Facile UV Patterning of Robust Carbon Nanotube Forests Using Perfluoroarylazides,” *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 4238.
- [59] F. Momicchioli, A. S. Tatikolov, D. Vanossi, and G. Ponterini, “Electronic structure and photochemistry of squaraine dyes: Basic theoretical analysis and direct detection of the photoisomer of a symmetrical squarylium cyanine,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 396.
- [60] M. Matsui, M. Fukushima, Y. Kubota, K. Funabiki, and M. Shiro, “Solid-state fluorescence of squarylium dyes”, *Tetrahedron*, **2012**, 68, 1931.
- [61] K. Jacob, A. Treibs, “Cyclobutenderivate der Pyrrolreihe”, *Ann. Chem.*, **1966**, 162, 153.
- [62] M. H. Sleiman and S. Ladame, “Synthesis of squaraine dyes under mild conditions: Applications for labelling and sensing of biomolecules,” *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 5288.
- [63] L. Hu, M. Stuart, J. Tian, K. Maurer, and K. D. Moeller, “Building addressable libraries: Site-selective use of Pd(0) catalysts on microelectrode arrays,” *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 16610.
- [64] G. W. Kabalka, M. R. Akula, and J. Zhang, “Synthesis of radioiodinated aryl iodides via boronate precursors,” *Nucl. Med. Biol.*, **2002**, 29, 841.
- [65] R. B. Wagh and J. M. Nagarkar, “Facile and effective approach for oxidation of boronic acids,” *Tetrahedron Lett.*, **2017**, 58, 4572.

- [66] M. T. Islam, X. Shi, L. Balogh, and J. R. Baker, "HPLC separation of different generations of poly (amidoamine) dendrimers modified with various terminal groups," *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 2063.

6. Anexos

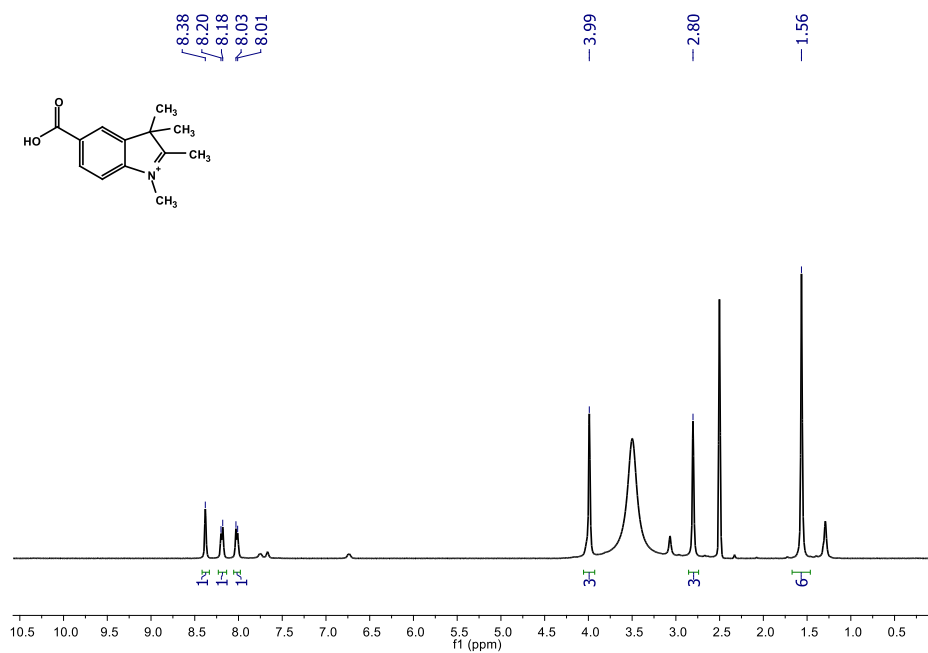


Figura 6.1. ¹H NMR em DMSO-*d*₆ do intermediário **3**.

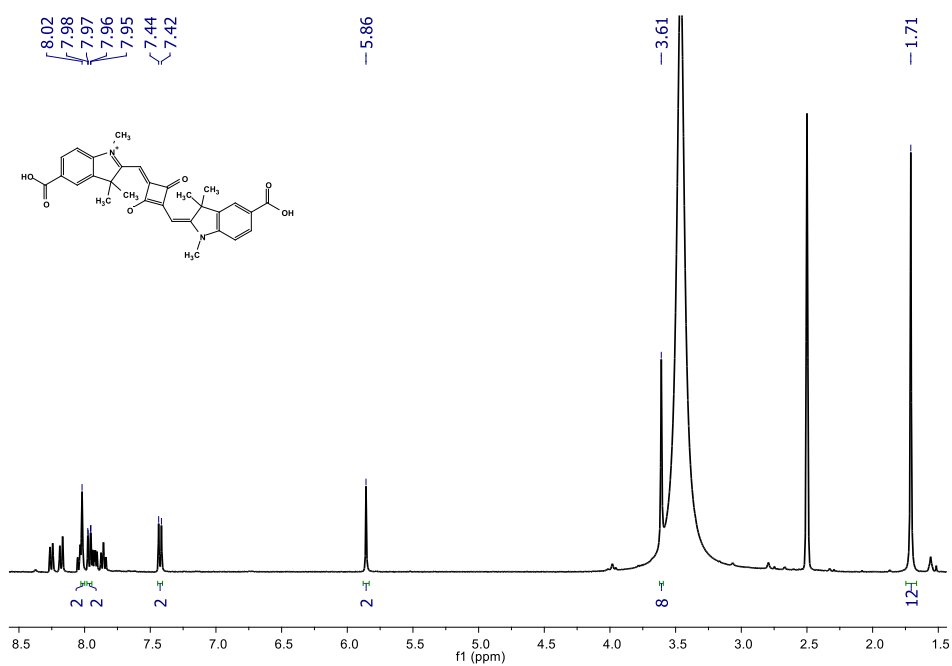


Figura 6.2. ¹H NMR em DMSO-*d*₆ do intermediário SQ-IND (**4**).

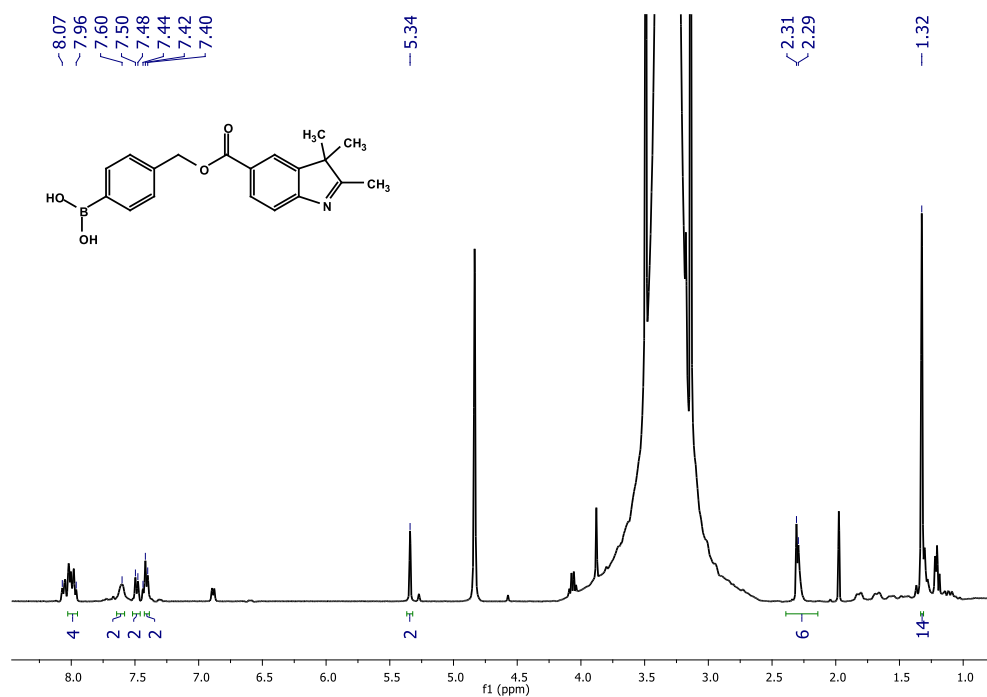


Figura 6.3. ¹H RMN em MeOD do éster da indolenina (5).

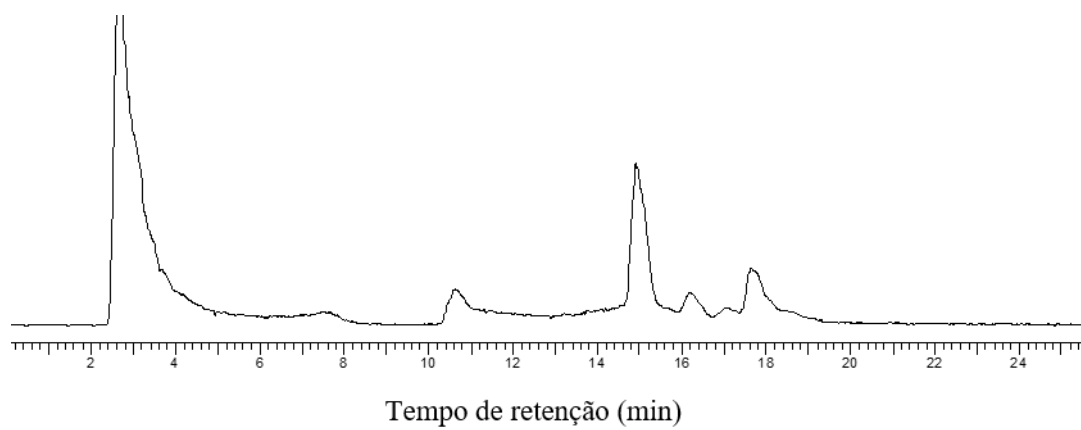


Figura 6.4. Cromatograma (gama) da radioiodação da SQ-BA mmediada por CAT – 2 horas de reação.

